

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-502608

(43) 公表日 平成11年(1999) 3月2日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

G 0 1 N 21/64

G 0 1 N 21/64

B

27/447

30/74

Z

30/74

33/483

Z

33/483

33/543

C

5 9 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 115 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-515700
(86) (22) 出願日 平成6年(1994) 1月18日
(85) 翻訳文提出日 平成7年(1995) 7月18日
(86) 国際出願番号 PCT/EP94/00117
(87) 国際公開番号 WO94/16313
(87) 国際公開日 平成6年(1994) 7月21日
(31) 優先権主張番号 P4301005.9
(32) 優先日 1993年1月18日
(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)
(31) 優先権主張番号 PCT/EP93/01291
(32) 優先日 1993年5月22日
(33) 優先権主張国 オーストリア (AT)

(71) 出願人 エボテック・バイオシステムズ・ゲゼルシ
ャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフ
ツング
ドイツ連邦共和国、ハンブルグ D-
22529、グランパーク 64
(72) 発明者 リグレス・ルドルフ
ドイツ連邦共和国、ゲッチンゲン D-
37077、アム ファスベルク、マックス
プランク-インスティテュート・フィア・
バイオフィジカリッシェ・ケミエ
(74) 代理人 弁理士 塩澤 寿夫 (外1名)

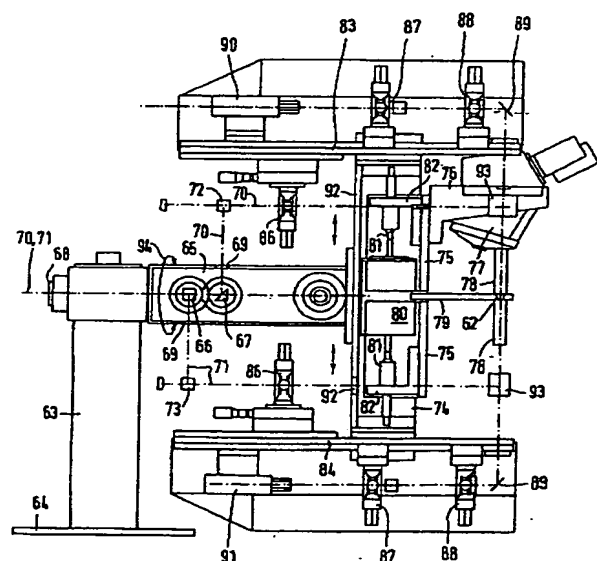
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体高分子の適応度を評価するための方法および装置

(57) 【要約】

500ms 以下の測定時間および分析される分子の短い拡散距離を特徴とするレーザー励起FCSを用いた、特に1 μ M以下の希釈液中の一つの分子または少数の分子を同定する方法であって、検定される分子の発光値を決定する物質特異的パラメータを測定することにより望ましくは 10^{-14} l以下の小容積ユニットの測定が行われる。本発明を実施するのに使用される望ましい装置は非常に希釈した溶液の小測定部分の蛍光励起のため、および共焦点結像による次の測定における発光を結像するためのそれ自身知られた顕微鏡システムであり、少なくとも一つの望ましくは1.2N.A.以上の高開口数の光学システムを使用し、光量が顕微鏡対物レンズの後ろにある対物板中の共焦点的に配置したピンホール開口によって制限され、かつ、測定部分は観察用対物レンズから0乃至1000 μ mの距離に位置する。

FIG.25



【特許請求の範囲】

1. 測定時間500ms以下で、かつ分析する分子の拡散経路が短いレーザー励起FC Sを用いた、特に $1\ \mu\text{M}$ 以下の濃度に希釈した1つまたは少数の分子を同定する方法であって、少なくとも1つの望ましくは 10^{-14} l以下の小さな容積ユニットまたは多数の該容積ユニットにおいて、測定されるべき分子の発光測定によって決定される物質特異的パラメータを決定することによって行われる方法。
2. 前記物質特異的パラメータとして、並進拡散係数、回転拡散係数、励起および発光波長、発光置換基の各励起状態の寿命、またはこれらの測定量の組み合わせを決定する請求項1記載の方法。
3. 定常的または非常にゆっくり拡散する発光複合体を分析するために、測定容積に対し試料容積を動かすこと、および／または経時的にレーザービーム光の位置および／または検出光学系の焦点の位置を変化させることにより、測定容積の空間座標を分析中に試料容積の空間座標に対して変化させる、但し、測定した並進拡散係数が実質的な並進拡散係数と測定部分の座標の上に載せた相対的位置と変化の組み合わせに対応している、ことを特徴とする請求項1および2の少なくとも1項記載の方法。
4. 前記測定部分の座標の経時変化が、定常的または非常にゆっくり拡散する発光複合体の見かけの拡散時間を規定することを特徴とする請求項3記載の方法。
5. 置換基の発光が測定されるべき分子と直接相互作用し、該置換基が測定されるべき分子のタイプまたは機能と相関する分光学的パラメータを有する発光リガンドまたはリガンド複合体である、ことを特徴とする請求項1乃至4のいずれか1項記載の方法。
6. 相関の評価による並進拡散および／または回転拡散の測定を用いた機能性の評価が、特に、存在する分子の絶対数および／またはその経時変化の測定により、および／または構造的に異なるリガンドおよび／またはリガンド複合体の特異的濃度の測定により、かつそれらから誘導される特異的相互作用の熱力学的結合定数および／またはリガンド結合分子に関する特異的認識反応または酵素過程の速度定数を通して行われる請求項1乃至5の少なくとも1項記載の方法。

7. 前記測定分子または分子複合体がイオン性または非イオン性である請求項1乃至6の少なくとも1項記載の方法。
8. 前記測定が時間に対して一定または変化するスーパーインポーズされた(super-imposed)電場または磁場中で行われることを特徴とする請求項1乃至7の少なくとも1項記載の方法。
9. 試料容積のイオン性分子または分子複合体が測定エレメントを通過すること、または短時間測定エレメント中に留まることを整流した電場または交流電場で強制する請求項8記載の方法。
10. もし電氣的分子トラップを使用するなら、標識したリガンドが複合体を作るターゲット分子よりも小さい荷電を有するか、またはターゲット分子の荷電と反対荷電を有することを特徴とする請求項8 および/または9の少なくとも1項記載の方法。
11. 前記分析が遊離した色素標識リガンド、特に核酸プローブを特に複合体化したリガンド、特に核酸ハイブリッドから分離するための電気泳動分離法と組み合わせられ、かつ多重に結合蛍光色素を有するリガンドを使用することが望ましいことを特徴とする請求項1乃至10の少なくとも1項記載の方法。
12. 標識テスト試薬および分析物の複合体および検出すべき遊離の分析物を第1の電気泳動ステップで予備濃縮し、かつ検出すべき複合体を第2の電気泳動ステップで測定容積エレメントに輸送することを特徴とする請求項1乃至11の少なくとも1項記載の方法。
13. 発光性リガンドおよび/または発光性リガンド複合体が量子収率0.1以上で30,000以上の吸光係数を有すること、および/または効果的測定時間を短縮するために発色リガンドとして1つ以上の色素オリゴマーを使用することを特徴とする請求項1乃至12の少なくとも1項記載の方法。
14. 前記測定部分がエマージェンス対物レンズから1000 μ m以下の作動距離に配置され、該対物レンズは直接試料容積に接しているか、または試料容積が透明シートでエマージェンス・レンズから分離されていることを特徴とする請求項1乃至13の少なくとも1項記載の方法。
15. 前記規定された分子および/または分子の平衡混合物および/または速度反

応過程は少なくとも1つの試料容積エレメントで分析され、複数の試料容積エレメントの場合、該エレメントが二次元配列の二次元キャリア上、特にメンブレンまたはシートおよび／またはウェハ表面に、または線状に望ましくはキャピラリー中で配列し、望ましくは試料容積が試験管内で修正した天然の細胞内または細胞上、および／または人工的に調製したベシクル、特にリボソームまたはベシクル形成性を有する可溶性ポリマーに基づくベシクル中に存在することを特徴とする請求項1乃至14の少なくとも1項記載の方法。

16. 前記各試料容積がマイクロディスペンシング・システムを用いて生成することを特徴とする請求項1乃至15の少なくとも1項記載の方法。

17. 前記表現型的に選択したDNA 又はRNA の遺伝子型への接近は各容積エレメントの局所的位置をマークすること、望ましくは光学的マーキング用の光化学的活性化可能な物質を用いた表現型分析に使用されるレーザーシステムを用いること、または可溶性または表面結合型の選択された容積エレメントの内容物と接触し、特にソラレン誘導体により、および結合した構造エレメント、特にオリゴヌクレオチドまたはビオチンまたはアビジンまたはストレプトアビジンまたはオリゴペプチドまたは金属錯化試薬またはこれらの組み合わせ物に結合した活性化可能物質への特異的結合により選択された遺伝子型の構造エレメントと安定な化学的相互作用を行いうる光化学的活性化可能な試薬による選択された遺伝子型の選択的分離を可能にすることにより対応する測定位置の光化学的標識をマーキングすることによる対応する測定位置の光化学的標識で可能となることを特徴とする請求項1乃至16の少なくとも1項記載の方法。

18. スクリーニング操作において、医学的に活性のある物質をレセプターに対する発光標識リガンドの結合で該相互作用を検定する事による特異的レセプターとの相互作用で分析し、そのキャリア細胞上の天然のレセプター、ならびにレセプターを過剰発現するキャリア細胞上のレセプター、または発現された分子または分子複合体の形のレセプターを使用することを特徴とする請求項1乃至17の少なくとも1項記載の方法。

19. 潜在的に活性な物質および特異的レセプターおよび特に標識された生理学的リガンドとの相互作用の分析において、異なる結合能が変異体および標識され

た天然のリガンドの結合を妨害する事で測定される少なくとも2つのレセプターが使用されることを特徴とする請求項1乃至18の少なくとも1項記載の方法。

20. 試料容積内で特異的レセプターまたは生細胞の細胞内物質との潜在的活性物質の相互作用の分析において、細胞の主要な部分が分裂可能か、または代謝的に活性を維持していることを特徴とする請求項1乃至19の少なくとも1項記載の方法。

21. 特異的認識反応の検出に関して、潜在的活性物質が複雑な天然、合成または半合成混合物中に存在し、かつ、該混合物が分析前にクロマトグラフィーで分離される、但し、望ましくは特異的認識反応で競合する標識化リガンドをクロマトグラフィー分離後に分離されたフラクションに添加し、かつ引き続いて競争反応をターゲット分子との特異的相互作用で分析する、ことを特徴とする請求項1乃至20の少なくとも1項記載の方法。

22. 前記クロマトグラフィーユニットの代わりに、試料ディスペンジョン・ユニットを使用することを特徴とする請求項1乃至21の少なくとも1項記載の方法。

23. 試料容積中の相同的な相補的核酸分子のタイプおよび/または数をハイブリダイゼーションにより、少なくとも1つの標識した核酸プローブを用いて分析する、但し、望ましくはプローブ結合色素標識がプローブの二次構造と相互作用しないか、または望ましくは特異的相互作用が可能であり、かつ、特に置換型チアゾール・オレンジ色素を用いることで分光学的蛍光挙動を変化させる、ことを特徴とする請求項1乃至22の少なくとも1項記載の方法。

24. 核酸検出を目的とした標識プローブとしては、望ましくは合成または細胞性RNA またはDNA 型の特定の極性を有する(+ または- 鎖) 過剰成分としての一本鎖核酸を使用することを特徴とする請求項23記載の方法。

25. ハイブリダイゼーションにおける複合体形成の反応速度がカオトロピック塩および/または有機溶媒、特にフェノールを含む媒体中で検定を行うことで促進されることを特徴とする請求項23および/または24の少なくとも1項記載の方法。

26. ハイブリダイズした核酸の相補性の程度を複合体の熱力学的安定性を介して分析することを特徴とする請求項23乃至25の少なくとも1項記載の方法。

27. 相補的核酸の検出が内部標準を用いて定量され、該内部標準が少なくとも1つの点突然変異で定量される核酸の配列と区別され、かつ該分析が内部標準とプローブの複合体および分析する核酸分子とプローブの複合体の種々の構造が色素分子の並進拡散および／または回転拡散に関して区別される温度で行われることを特徴とする請求項23乃至26の少なくとも1項記載の方法。
28. 色素標識リガンドとの複合体形成の感度が、有効反応容積を減少する、および／または反応物周囲の水和を変化させる、および／または特にポリマーおよび／またはオリゴマー、望ましくはポリエチレングリコール類、デキストラン類、タンパク質類、ポリビニルピロリドン類、カオトロピック試薬類、有機溶媒などを使用することにより相分離により反応物の有効濃度を實現する、特異的反応物を反応媒体に添加することにより会合速度を増加することで増進されることを特徴とする請求項1乃至27の少なくとも1項記載の方法。
29. 検出されるべき複合体を、望ましくはテスト試薬および検出されるべき分析物との複合体の間のサイズおよび／または形の差を増加する目的で過剰量添加される少なくとも1つの付加的リガンドと反応させることを特徴とする請求項1乃至28の少なくとも1項記載の方法。
30. 検出反応の特異性を、望ましくは反応物に対し過剰となるテスト試薬の組み合わせ物との少なくとも三者複合体を形成させることで増加し、蛍光検出される色素が少なくともモノマーとして結合する第2のテスト試薬の蛍光色素の励起に適合する発光波長を有する少なくとも1つの色素リガンドで少なくとも1つのテスト試薬が標識されていることを特徴とする請求項1乃至29の少なくとも1項記載の方法。
31. 少なくとも2つの分析物が、少なくとも2つの独立した異なる色素で標識され、かつ、異なる波長の光で励起されるか、または異なる発光波長の光で独立して検出される2つの異なるテスト試薬の反応により、1回の検定の1つの試料と一緒に分析されることを特徴とする請求項1乃至30の少なくとも1項記載の方法。
32. 特定の分析物が、各々少なくとも2つの光学的に異なる蛍光分子で標識された少なくとも2つのテスト試薬と同時に複合体を形成し、該同時複合体形成が

エネルギー転移複合体の形成および／または異なる励起および／または発光波長を有するシグナルの時間相関によって検出されることを特徴とする請求項1乃至31の少なくとも1項記載の方法。

33. 試料がベシクル構造の混合物、特に液体保有ベシクル、特にVLDL、LDL および／またはHDL 型のベシクルに対し、該ベシクルを蛍光標識抗体で染色することおよび／または蛍光標識分子を特異的および持続的にベシクル構造に取り込むことにより分析することを特徴とする請求項1乃至32の少なくとも1項記載の方法。

34. 試験管内タンパク質生合成の産物を、特異的結合性または酵素活性に関して分析することを特徴とする請求項1乃至33の少なくとも1項記載の方法。

35. オリゴマーまたはポリマー分布物が平均並進拡散係数および／または平均回転拡散係数およびそれぞれの分布の半値幅に関して分析されることを特徴とする請求項1乃至34の少なくとも1項記載の方法。

36. 望ましくは固定化細胞または細胞会合物、組織、オルガネラ、ゲル構造物およびその他の三次元的に仕切られた試料容積を含む固定化構造をもつ試料容積において、いくつかの容積エレメントが特定の分子のダイナミクスまたは反応速度に関してカバーされており、該容積エレメントの位置座標も同様に考慮され、かつ、続いて容積エレメントが二次または三次元的像に組み合わされることを特徴とする請求項1乃至35の少なくとも1項記載の方法。

37. レセプター分子および試料中に存在しうるリガンドの間の複合体形成が溶液中の色素標識リガンドとの競争、または固相結合分子の関与、または細胞関連分子の関与により分析され、かつ、生物学的試料がシート状で提供されることで分析されるべき測定部分が $1000\mu\text{m}$ 以下の望ましい距離で分析されることを特徴とする請求項1乃至36の少なくとも1項記載の方法。

38. 蛍光の偏向解消の検出を目的とした検定法として開発されたキット・システムを使用する請求項1乃至37の少なくとも1項記載の方法。

39. 望ましくは固定化細胞または細胞会合体、組織、オルガネラ、ゲル構造物を含む三次元的構造を有する試料容積中におけるダイナミック・プロセスまたは反応速度プロセスの二次元的または三次元的結像を目的とした請求項36記載の

方法の使用。

40. 表面固定調製物、特に染色体、転写複合体、翻訳複合体、または細胞または組織構造体などの高分子複合体の、望ましくは少なくとも2つの本発明に従って標識したリガンドの使用による特定のターゲット分子の局在化および／または参照位置に対する空間的相関によるインサイチュウ分析を目的とした請求項1乃至39の少なくとも1項記載の方法の使用。

41. 評価すべき容積エレメントを反応条件に同時にまたは連続的にさらし、かつ、限定した反応時間後、反応産物の分析を行うことによる特異的物質の転換または色素リガンド保有分子の結合反応の反応効率の測定を目的とした請求項1乃至38の少なくとも1項記載の方法の使用。

42. 特異的分子および／または分子複合体および／または分子および／または分子複合体の分子環境を定性的または定量的にカバーすること、特に生理的に活性なレセプター、特に表面レセプターの測定および／または評価またはレセプター結合リガンド又はリガンド複合体の評価等を目的とした請求項1乃至38の少なくとも1項記載の方法の使用。

43. 発光団保有リガンドと検索分子のレセプター分子への競合的結合を測定することによるラジオイムノアッセイまたは酵素結合イムノアッセイの代替法としての請求項1乃至38の少なくとも1項記載の方法の使用。

44. 複製分子、特に核酸またはそれらに由来するタンパク質またはペプチド、複雑な化学反応生産物、化学反応で合成された生産物の複雑なシステム、または細胞合成産物などの二次代謝物の複雑な混合物のような複雑な分子集合体を分析することを目的とした請求項1乃至38の少なくとも1項記載の方法の使用。

45. 複雑な物質混合物の分析を分析的分画を含めてオンラインで行う請求項1乃至38の少なくとも1項記載の方法の使用。

46. 分子、分子複合体または細胞、特に精子、単球、収縮性エレメント、活性または能動輸送分子およびメンブレン分子の移動度の測定を目的とした請求項1乃至38の少なくとも1項記載の方法の使用。

47. 非常に希釈した溶液の小さな測定部分における蛍光の励起のためのレーザーフォーカシング用、および次の測定のための発生した蛍光の共焦点的結像用に

知られている顕微鏡光学系を含み、望ましくは $\geq 1.2N.A.$ の高開口数の光学システムを少なくとも1つ使用し、光量は顕微鏡の対物レンズの後ろにある対物板にある共焦点的に配置したピンホール開口で制限されており、および／または測定部分は望ましくは観察用対物レンズから $1000\mu m$ の距離に位置する請求項1乃至38の少なくとも1項記載の方法を実施するための装置。

48. 測定シグナルの生成側に、レーザー光(21)をプレ・フォーカシングするための装置(20)、該レーザー光(21)を屈折させるための二色性ミラー(30)、および測定容積にレーザー光をフォーカスするための付加的レンズ(40)が提供され、かつ、観察ユニットが光子計数装置(52)、相関装置(71)、およびマルチチャンネル・スケーラー装置(72)を有し、かつ場合によっては測定シグナルがコンピュータで処理および／または評価される、測定シグナルを生成するユニットおよび観察ユニットを含むレーザー光の回折制限フォーカシングを行うための請求項47記載の装置。

49. プレ・フォーカシングのための装置(20)に顕微鏡光学系に相当するレンズ(22)およびアレイ(23)が提供され、光軸を合わせたレーザー光(21)がレンズLにより結像板 B_1 上および前記アレイ(23)により結像板 B_2 (第1像)上にフォーカスされる請求項48記載の装置。

50. 前記アレイ(23)にプレ・フォーカスしたレーザー光(21)の径を変化させるための交換可能なレンズが提供される請求項49記載の装置。

51. 検出ユニットが、試料から検出器(53,54)に発せられる光(55)を分離するビーム・スプリッター(60)を有する2つの検出器(53,54)によって構成される請求項48乃至50の少なくとも1項記載の装置。

52. 発生した光(55)が各検出器(53,54)の前に結像レンズ(56,57)およびフィルター・エレメント(58,59)を通過する請求項52記載の装置。

53. 検出器(53,54)が異なる波長の光を検出する請求項48乃至52の少なくとも1項記載の装置。

54. 1つ以上の検出器エレメントが、場合によっては検出器アレイの形で結像板に設置される請求項48乃至53の少なくとも1項記載の装置。

55. ピンホール開口(50)が光路(55)に配置される請求項48乃至54の少なくとも

も1項記載の装置。

56. 90° を超える角度をとるような2つの対物レンズを使用することを特徴とする請求項47乃至55の少なくとも1項記載の装置。

57. 発光波長 >200 nmの波長を有する連続レーザー、特にアルゴン、クリプトン、ヘリウム-ネオン、ヘリウム-カドミウムレーザーまたは出力 0.5mW 以上で 20MHz 以上の高周波数を有するパルスレーザーを光源として使用することを特徴とする請求項47乃至56の少なくとも1項記載の装置。

58. 発光を検出するためになだれ型ダイオード検出器などの単一光子計数を目的とした装置が発光経路中、望ましくはピンホール開口の板中に配置され、かつ、シグナル分析をデジタル相関器またはマルチチャンネルカウンターで行うことを特徴とする請求項47乃至57の少なくとも1項記載の装置。

59. 測定部分が2つのキャピラリー間の試料容積内に固定され、該キャピラリーは外側に化学的に不活性な導電性コーティング、特に金属蒸着コーティング、特にクロム・プライミング上の金蒸着コーティングが施され、前記導電性コーティングはコンピュータ・コントロールされる整流(rectified)電場または交流電場に連結され、さらに測定部分を通して互いに電氣的に連結されていることを特徴とする請求項47乃至58の少なくとも1項記載の装置。

60. 互いに向き合う2つの顕微鏡光学系が測定部分を囲んでいることを特徴とする請求項47乃至59の少なくとも1項記載の装置。

61. 分析する試料および／または洗浄液のチャージ／ディスチャージを目的とした少なくとも1つの口を有する少なくとも1つの電気泳動セル、壁電極、リング電極、ネハー(Neher)キャピラリー、キャピラリー末端の電極および液滴出口を有する電気泳動装置が提供されることを特徴とする特に請求項47乃至60の少なくとも1項記載の装置。

62. 少なくとも四個の電極、望ましくはピン電極または望ましくは <1 mmの穴が整列しているウェハ構造物の蒸着電極を有する四極子エレメントを有する電気トラップであって、望ましくは少なくとも六極子配置の少なくとも2つの付加的電極と組み合わせ、四極子エレメントには交流(alternating)電圧が提供され、かつ、六極子電極には直流(direct)電圧をかけて、その結果、その極性が

分析する分子の荷電と反対となる電気トラップを特徴とする請求項61記載の装置。

63. 試料を受け取ることを目的としたシートは、特にイオン交換リガンドまたはアフィニティリガンド、特にオリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはキレート試薬、特にイミノ二酢酸またはニトリロ三酢酸リガンドの形で分子誘導体化による分子に対する特異的結合性を有しており、特にシートが特異的部位においてリガンドとして異なる結合特異性の異なる分子構造を有していることを特徴とする請求項61および62の少なくとも1項記載の装置。

64. 試料容積が二次元または三次元的にコントロール可能な試料受容装置に固定されており、のぞましくは試料が二次元的または三次元的ピエゾ素子を用いて測定光学系に対して限定された空間座標に固定しうることを特徴とする請求項61乃至63の少なくとも1項記載の装置。

65. 前記装置が限定された座標においてレーザー光を屈折し、および／または焦点位置を明確に決定しうる装置を装着することを特徴とする請求項61乃至64の少なくとも1項記載の装置。

66. 単一微生物、特に細菌、懸濁細胞またはウイルスを検出および／または同定する方法であって、天然または遺伝子組み換えした膜タンパク質の表面発現構造エレメントと蛍光標識したターゲット分子との特異的相互作用または酵素活性を同定基準として検出する方法。

67. 少なくとも1つの遺伝子産物が内膜または外膜または外皮に提示される微生物の少なくとも1つの特異的遺伝子を検出および分取することを目的とした請求項66記載の方法の使用。

68. 限定された遺伝子セグメントの遺伝子産物の機能を決定することを目的とした請求項66記載の方法の使用。

69. いくつかの小さい容積エレメントを共通するより大きい、またはいくつかの小さい励起容積の内から測定容積として分析する、および／または試料内の1又は複数の測定容積の空間座標の変化を伴い、または伴わないで連続的に分析することを特徴とするいくつかの小さい容積ユニット中の一つ以上の分子を同定することを目的とした請求項1記載の方法。

70. 全てまたはいくつかの測定容積を含む励起容積を照射する光学系を有する、またはいくつかの励起容積の平行照射を行う光学システムを有するマルチアレイ検出器を使用する前記方法を行うことを目的とした装置。

71. 蛍光光度法を用いて望ましくは 10^{-14} l 以下の小さい測定容積中の、特に $1\mu\text{M}$ 以下の濃度に希釈した1つ以上の分子、分子複合体、および／または分子フラグメントを検出することを目的とした装置であって、

(a) 第1の波長のレーザー光を発生するためのレーザー光発生装置、

(b) 測定容積内にレーザー光を高度にフォーカスし、レーザー光が基本的に測定域のみをカバーするような測定容積にレーザー光をフォーカスすることを目的としたフォーカシング装置、

(c) 一つ以上の分子、分子複合体および／または分子フラグメントのレーザー光励起によって発生した蛍光を検出することを目的とした検出装置、および

(d) 検出装置によって検出される蛍光量を制限するための測定容積に対して共焦点的に蛍光の光路内の対物板に配置されたピンホール開口であって、特に直径 $100\mu\text{m}$ 以下、望ましくは $20\text{--}30\mu\text{m}$ 以下のピンホール開口、

以上(a)乃至(d)の装置を含む装置。

72. 測定容積および対物板間のイメージ・スケールが $1:100$ 、 $1:60$ または $1:40$ であり、かつ、測定容積は各方向に $0.1\mu\text{m}$ 以下の大きさを有する場合、前記ピンホール開口が各々直径約 $10\mu\text{m}$ 、 $6\mu\text{m}$ または $4\mu\text{m}$ であることを特徴とする請求項71記載の装置。

73. レーザー光に関する光学系および／または蛍光に関する光学系が望ましくは 1.2N.A. 以上の高開口数を有することを特徴とする請求項71または72記載の装置。

74. 測定容積がフォーカシング装置から最大 $1,000\mu\text{m}$ まで離れていることを特徴とする請求項71乃至73のいずれか1項記載の装置。

75. フォーカシング装置がレーザー光をプレ・フォーカスするためのプレ・フォーカシング装置および測定容積上にプレ・フォーカスされたレーザー光をフォーカスするためのフォーカシング対物レンズを有することを特徴とする請求項71乃至74のいずれか1項記載の装置。

76. フォーカシング対物レンズと測定容積の間の距離が $1,000\ \mu\text{m}$ 以下であることを特徴とする請求項74および75記載の装置。

77. プレフォーカシング装置およびフォーカシング対物レンズの間に半透明の鏡を置き、フォーカシング対物レンズにプレ・フォーカスしたレーザー光を屈折させることを特徴とした請求項75記載の装置。

78. フォーカシング対物レンズに面さない半透鏡側にピンホール開口を配置することを特徴とする請求項77記載の装置。

79. 検出装置が蛍光を検出するための少なくとも一つ、望ましくはそれ以上の検出器を有することを特徴とする請求項71乃至78記載の装置。

80. ピンホール開口と検出装置の間に少なくとも一つの光学フィルター、および／または少なくとも一つ以上の結像レンズおよび／または少なくとも一つの半透鏡および／または少なくとも一つの反射鏡を配置することを特徴とする請求項71乃至78記載の装置。

81. 第一の波長と異なる波長の付加的レーザー光を発生するための付加的レーザー光発生装置、基本的に付加的レーザー光が測定容積を独占的にカバーするように高度に測定容積に前記付加的レーザー光をフォーカスするための付加的フォーカシング装置、一つ以上の分子、分子複合体および／または分子フラグメントの励起によって生成する蛍光の検出を目的とした付加的検出装置、および二つの検出装置を連結する相関ユニットを特徴とする請求項71乃至80のいずれか1項記載の装置。

82. (a)第一の支持アーム(65)と第一の支持アーム(65)に直行して連結された第二の指示アーム(74)を含むT型支持体、

(b) 二つのレーザー光および二つの蛍光に対する光学エレメント(レンズ、フィルター、ミラー、検出器)の光軸を合わせ、これらを支持する第二の支持アーム(74)に面して末端に配置された支持装置(83,84)であって、フォーカスされたレーザー光が、測定容積を有し、かつ、第二の支持アーム(74)に面するように支持され、その両端間で望ましくは中間に分離可能なように配置されているガラススライド上に入射される装置、

(c) 二つの支持装置(83,84)が長さ方向に第二の支持アーム(74)に面して各末

端と同期して動くことができ、二つの支持装置(83,84)が第一の支持アーム(65)の方向に張り出し、二つのレーザー光が支持装置(83,84)で支持されているレーザー光の光学エレメント上に第一の支持アーム(65)の内側から光学的開口(69)を通して屈折鏡および／または半透鏡(66,67,72,73)によって屈折されうる、

以上(a)乃至(c)の事項を特徴とする請求項81記載の装置。

83. レーザー光用の光学エレメントが二つの支持装置(83,84)の内側に互いに向き合うように配置しており、かつ、蛍光用の光学エレメントが二つの支持装置(83,84)の外側に互いに向き合わないよう配置していることを特徴とする請求項82記載の装置。

84. フォーカシング対物レンズの一つが、特に該フォーカシング対物レンズの焦点のオフセットを解消するようにピエゾ素子で動かされる調節エレメントで位置決めされうることを特徴とする請求項82または83記載の装置。

【発明の詳細な説明】**生体高分子の適応度を評価するための方法および装置**

本発明の目的は、レーザー励起蛍光相関分光光度法を用いた、特に $1\ \mu\text{M}$ 以下の希薄溶液中の一つまたは少数の分子の同定方法、特定の用途における該方法の使用、並びに本発明の方法を実施するための装置に関する。

近年、生物学的活性分子の分析は特異性および感度の点で着実に進歩しており、また、基本的に新しい技術によって補われてきている。この点に関しては従来の分析技術に適応しうる量にまで単一の細胞または分子を増幅するクローニング法または遺伝子物質の酵素的増幅を挙げることが出来る。しかし、多くの場合、定性的にも定量的にも単一分子または数分子に直接適応しうる十分な感度を有する分析法があればより望ましい。

例えば、電子顕微鏡は、単一分子を直接検出しうる技術である。トンネル型電子顕微鏡を用いた単一のDNA分子の配列決定が試みられている。しかし、この方法は非常に煩雑である。

単一分子の単なる分析だけではなく、構造や他の分子との相互作用または分子構造など、その分子の状態パラメータに関する情報も多くの分野で重要である。

最近の進化的生物工学的方法は非常に複雑な分子集合体に関するものである。その目的は標的構造と特異的相互作用を起こす分子を同定すること、即ち、望ましい機能に関する特定の適応度を測定することである。この適応度は結合定数または速度定数などの熱力学的パラメータに帰結させることができる。

例えば、分析する分子が低濃度でのみ存在する場合、検定法の感度を増加することは問題の解決にとってさして重要ではないことがしばしばある。むしろ、多かれ少なかれ同時に分析すべき大量の試料に対処しなければならない。例えば、 10^6 個の分析試料を時間のスケールで分析しなければならないなら、試料を1msから最高で1s以内で測定および評価しうる分析法しか考えられないのは明白である。本発明に課せられた問題は、取り分け、単一分子の単なる分析に止まらず、他の分子との特異的相互作用または得られた分子構造に関する情報を得られる方法を提供する事である。さらに、多量の試料を同時に分析することである。

本発明の方法は化学発光に基づいており、また蛍光相関顕微鏡(FCS)の名前で知られている技術を利用している。蛍光性を有する発色分子構造を用いて発色性リガンドの分子環境に関する情報を得ることができる。化学発色団の回転拡散および並進拡散は、相互作用分子へのエネルギー移動の種々の経路、化学反応速度および励起状態の寿命と同様に測定しうる。

物理化学的現象に基づき、本発明は単一分子または少数分子から該分子の性質に関する情報ならびに一つの分子について特定される一つの化学発色団の種々の状態の分子種数に関する情報または特定の相互作用機能に関する適応度の情報を得るために分光学的測定パラメータを利用した新しい解答を提供している。

今日まで約20年間、D.マグデ(Magde)のグループ(エルソン(Elson), E.L.およびマグデ(Magde), D.(1974)蛍光相関顕微鏡、概念および理論; Biopolymer 13, 1-27)およびR.リグラー(Rigler)(アーレンバーク(Ehernberg), M.およびリグラー(Rigler), R.(1974)回転ブラウン運動および蛍光強度の揺らぎ; Chem.Phys. 4, 390-401)により追跡されてきた蛍光相関顕微鏡法は技術的な困難さから実際的分析法に組み込まれることはなかった。測定時間および色素の光誘導性消光(光消光)に関して上述の要求に答えることは出来なかった。リグラー(Rigler)等は分子の回転時間を測定できた。マグデ(Magde)等は揺らぎ時間を通して特定の化学反応定数を測定しえた。

FCS 測定の原理はレーザー光の強力な励起光で溶液内の比較的限られた小さい容積エレメントを照射することにより非常に希薄な溶液(10nM以下)中の蛍光性分子を測定することである。この容積内に存在する対応する励起スペクトル特性を有する分子のみがこの光で励起される。この容積エレメントから発せられる蛍光の像が高感度のフォトマルチプライヤー上に結ばれる。もし、この溶液を希釈すれば各照射容積エレメント内に存在する分子濃度を有意に変化させうる。

特に非常に希薄な溶液は特定の時間内に特定の容積エレメント内に同時に存在する分子数の分布はポアソン分布を示す。一度この容積エレメント内に拡散してきた分子はその分子型に特徴的な拡散速度(並進)に従う平均的時間内に再びこの容積エレメントから出ていき、もはや観測できなくなる。もし、一つの分子が観測エレメント内で平均滞在時間内に何度も励起されるならば、この分子から多

くの発光シグナルが検出できる。別の言葉で言えば、希薄溶液の場合、一度観測エレメントに拡散してきた分子が再びその容積エレメントから離れる前に1回以上励起されうる確率は、新たに拡散してくる分子が励起される確率よりもはるかに大きい。この事に対応する発光シグナルが新たにそのエレメントに侵入してくる分子よりも同じ1つの分子から発せられる確率が大きいことを意味している。従って、発光シグナルの時間変化と関連する分子種の相対拡散時間の相関関係を明確にすることができる。

もし、励起光と発光の偏光面の回転をパラメータとして測定すれば、およその分子量、形状パラメーターまたは周囲のマトリクスに関する情報を引き出しうる分子の回転拡散係数を決定しうる。

同じ1つの分子を何回も（数千回）励起し、多くの単一測定に由来する発光シグナルを蓄積することにより希薄溶液中の単一分子を検出することさえ可能であることが判明している。

この測定原理の実質的な実現には多くの技術的困難がある。最近のレーザー技術を採用しても、この観察領域が大きすぎて低い並進拡散係数を有する生物学的分子は約50msも存在することになる。この時間は発色団として使用する各色素リガンドが消光されてしまうほど十分長い。頻繁に行われる励起が環境にある分子、特に酸素に対する発色構造の化学的反応性を増加し、発光は変化を受けるか、あるいは消光する。もちろん、発光（蛍光）の損失は分子の測定エレメントからの離脱と混同されることから光消光は測定誤差に直接結びつき、また、測定法を規格化することによる区別が困難であるか、あるいは異常な技術的経費によって始めて獲得されうることになる。

今日まで一般的に使用されている方法における本測定原理の実質的实现は狭い範囲に限定されてきたが、このことは本発明の方法によって克服されうる。

本発明に記載されているようにFCSの作業に関するルーチン方法への重大な進展は励起光学系の特定要素、単一光子検出および試料取扱法の同時使用を要求する試料総容積が μ l レンジとなる極小測定容積（望ましくは 10^{-14} - 10^{-17} l）の導入により達成される。実験レイアウトで示される装置の測定容積は 2×10^{-16} l であり、この容積はこれまで文献で見られる測定容積の約1000倍小さい。従っ

て、照射領域の大きさは約 $0.1 \mu\text{m}^2$ となる。FCS が特に測定容積当たり $0.1\text{--}10$ 個の色素分子濃度に対する正確なデータを提供するとすると、作業濃度は約 10^{-7} – 10^{-9}M となる。最高検出効率およびバックグラウンド補正を用いた測定は技術的に単一光子検出と組み合わせた高開口共焦点光学系で実現されうる。

もし拡散時間と比較して反応時間が遅いならば並進拡散によって結合定数が測定できる。この事は観察されるリガンドが観測領域に入ってから出るまでにその分子構造を変えないか、またはほとんど変えないことを示している。また、混合状態を示す相関関係も測定される。もう一度繰り返すと、分子の滞在時間が従来の観測領域の場合よりも約1000倍短くなることから、非常に小さい測定容積を用いた本発明の方法の重要性は明らかであり、例えばリガンド／レセプター相互作用などに関する、通常の大きさの平衡定数および速度定数の測定への道が切り開かれた。

1. 本発明の小容積測定領域の重要性

本発明の方法の実施に伴う小容積エレメントの重要性およびその使用は従来法とは異なる実験的特徴を有している。

小容積エレメントには以下に示す特徴がある。

- － バックグラウンド散乱光、特にラマン散乱光、
- － 光照射間の蛍光色素の寿命、
- － 短い測定時間、
- － 高分子複合体、ウイルス、細胞の拡散時間、
- － エレメントに存在しない複合体の統合／保存、および
- － 測定の間複合体の寿命。

以下の説明から小容積エレメントを実現する上で本発明に望ましい意味で同時に幾つかのパラメータが正の効果をもたらし、累積効果を通して本発明に関する問題に対して解答を出した方法論の非線型／指數的改善を行ったことは明白である。

単一分子の測定に必要なSN (シグナル・トゥー・ノイズ) 比1000は $f1$ およびサブ $f1$ 領域における小容積エレメントにより達成される。この比の低下は測定容積

の半径の 3 乗 (r^3) に比例する。この挙動は長いカラム容積をレーザー光が照射

し、実質的にビームの2次元内での拡散を解析していた初期の実験装置では完全に無視されていた。

それでも測定技術的理由からより大きい容積を分析するならば、本発明に従いマルチアレイ検出により多くの小容積エレメントを同時に測定すること、および／または、異なる空間部位の種々の小空間エレメントを連続して測定することが可能となる。測定容積としての各ガウス分布空間エレメントに対してSN比の特徴が維持される。本発明に従って、全ての空間エレメントは各々単一の空間エレメントの単一測定と同様に絞られた励起光で共焦点的に照射されることが望ましく、また、空間エレメントの像はピンホールでスクリーンに形成される。

単一分子の安全な同定および測定、および特定の測定時間における測定容積内の複合体化または遊離リガンドの数に基づく平衡定数の測定に必要な単一分子の計数の可能性に関する本技術の方法論的改善は、測定容積 10^{-14} l以下の使用により達成される。このことは、本発明に従い直径 $100\text{ }\mu\text{m}$ 以下、望ましくは $20\text{--}30\text{ }\mu\text{m}$ 以下のピンホール開口の使用、並びに予め絞られたレーザー励起光の使用により可能となる。対物板に存在するこの大きさのピンホール開口を用いると、 $0.33\text{--}0.5\text{ }\mu\text{m}$ のガウス測定容積の直径は60倍にも達する。異なる像スケールを有する光学系を使用すると、対応するピンホール開口を使用しなければならない。このことは遊離したローダミンに関して測定容積からの拡散平均時間が約 $40\text{ }\mu\text{s}$ となることを意味しており、一方従来技術では $750\text{ }\mu\text{s}$ となる。しかし、同時に1000倍以上も減少した測定容積における分子の滞在確率も1000倍以上小さくなり、その結果不都合に長い測定時間を要することになることから、ガウス分布測定容積の半径の10以上の減少は適当ではいなければならない。従って、本発明の本方法の至適測定容積は $10^{-14}\text{--}10^{-17}$ lとなる。とにかく可視光では減少した寸法の空間エレメントを光の回折性のためさらに大きく減少することはできない。しかし、このことは測定シグナルを発生するために核蛍光を励起する場合など本発明にしたがってX線照射を用いることにより克服しうる。

- 測定時間が実質的に許容されうる範囲 (msからs) にあること、
- SN比が1を超え、特に100から1000の範囲にあること、

－励起のための照射光による破壊が起こらないように小分子、分子複合体、または分子断片の拡散平均時間（測定容積を横切る）が大きくなること、

以上の特徴を踏まえて、至適ガウス分布測定容積は 10^{-14} l 以下、特に 10^{-17} l 以下となる。

SN比が高いことは、測定時間が短いことに加えて、適当なフィルターを使用していることでうまく説明される。簡便のため、これらの光学フィルターはラマン散乱光を抑制する緩衝バンドフィルターおよび／または 10^7 の懸濁因子に対応する 10^{-7} の光学密度を有する励起光波長に近い散乱光をカットするラマンカット・オフ・フィルターを使用する。

本発明の方法および本発明に従った単一分子、分子複合体、および／または分子断片の蛍光分光光度法用装置を使用するにあたって、励起用の照射光を鋭く絞り込むことに加えて、励起光のビーム経路中に非常に小さなオリフィスを有するピンホール開口が共焦点的に存在する事が重要である。対物板のピンホール開口のオリフィスサイズは像の大きさおよび対物板上に結像される測定容積の大きさに依存して選択される。40 (100) の像サイズおよび測定容積 $0.1 \mu\text{m}$ 以下の半径の場合、最低限 $4 \mu\text{m}$ ($10 \mu\text{m}$) のピンホール開口半径が必要となる。

バックグラウンド散乱光、特にラマン散乱光

試料を通過する励起光の強度がより強くなり、また単一光子検出器に結像される容積がより大きくなれば、試料中に存在する分子および固体によって散乱され検出器に到達する光の強度はより小さくなる。即ち、自己相関をとることによりそれらはシグナルと簡単に区別することができる。

本発明に従って、従来のフィルターで水のラマンバンドを抑制すると単一のローダミン分子を 0.2 fl の空間領域においてSN比1000で測定できる。このような小さい空間領域を用いずに従来の測定を行うとSN比は僅か 10^{-3} となる。

光照射中の蛍光色素の寿命

本発明に使用しうる生物学的に有用な蛍光色素は限られた寿命しか持っていない。フルオレセインなどの色素は明らかに光感受性が高い。しかし、特に大きい複合体の平均滞在時間の詳細な測定の場合、色素はその分子が再び測定容積の外

に出る前に約10,000-1,000,000回励起される。早熟の消光は並進係数を大きく見積もらせるので（小分子）、早熟の消光は測定結果に誤差を生じさせる。

高分子複合体、ウイルス、細胞の拡散時間- 短い測定時間

特に大きい分子複合体、ウイルスまたは細胞は極端に並進拡散係数が小さい。本発明のように測定容積が小さいと、ウイルスおよび細胞は結合した色素の有意な消光無しに取り扱うことができ、遊離のM13 DNA の場合の拡散係数は約 $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ であり、また大腸菌は約 $5 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ であった。この測定容積内の細菌の滞在時間は約30msであった。これまで可能であったより大きい測定容積ではこれらの大きい複合体が並進拡散により測定容積を出ていくまでに長い測定時間を要することになるであろう。

測定容積領域に存在しない複合体の統合／保存

色素が特定の化学反応により励起状態から反応し、消光してしまうことが統計的確率で起こる。もし、この事が測定容積以外から来る光で起こるならば、失活した色素がシグナルを全く提供せず、その測定に何ら寄与しないのでその測定は影響を受けない。しかし、この方法の質が測定可能な分子および分子複合体の効果的濃度が未だ測定容積以外に存在する色素標識分子の早熟消光で減少し感度が影響を受ける事により非常に制限を受ける。もしもレーザービームが最高までに絞りこまれていなかったら、これらの負の要因は煩わしいものになるであろうし、また、標識分子が本発明の望ましい態様である幾つかの色素分子として提供されているならばその分子の測定不能部分は予備照射で予め消光させておかれる。

測定の間複合体の寿命

検出される標的分子および標識したテスト試薬の複合体は、該複合体が測定時間を通して安定に存在する場合に限り本発明の方法で検出が可能である。このことは、複合体がそれ自身秒の単位の衰退時間を有する場合の、大きい測定容積内

の平均滞在時間が秒の範囲にある場合について論じているのではない。この事は例えば結合定数 $10^6 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ の金属イオン複合体化等の生物学的反応に関するものである。しかし、本発明に従う小容積エレメントは短い平均滞在時間を意味しているので（<1ms）、実際の全ての複合体化反応において複合体は測定容積内

の滞在時間を通して安定に存在する。

マルチアレイ検出

本発明のマルチアレイ検出は、マルチアレイ検出器上に別々に結像された種々の容積領域を持つ大きい容積領域を非至適様式で照射し、かつ、入射した光子を記録し測定の際に別々に評価する事で達成される。この事は市販のマルチアレイ単一光子検出器を用いることで可能である。この方法の1つの欠点は望ましくない照射が測定容積外の有意な光失活を起こしてしまうことにある。マルチアレイ検出、即ち種々の空間位置での測定容積の並行FCS分析または種々の空間位置の測定容積の連続的FCS分析において、比較的大容積エレメントが実験アレイにおいて照射されるのは今まで述べてきた意味で利点無く、一方、小空間エレメントの測定は2Dパターンに整列させた小さな空間エレメントを同時に結像させ、測定し評価する事によって達成される。この実験においては(第24図)、多くの発色団が拡散により測定容積内に到達するまでに消光してしまうであろう。

低濃度では、比較的容積が大きいエレメントが測定される。測定時間は必要とされる測定データの精度(SN比)に依存して10乃至100msの範囲にあるので、10,000から100,000個の測定容積は1000sで測定される。従って、 10^{-14} - 10^{-15} Mの極端に低い濃度が測定される。この事は結合定数 $k_{a,ss} \geq 10^6 \text{ mol/l}$ から $k_{a,ss} = 10^5 \text{ mol/l}$ までの特異的生物学的相互作用が測定できることを示している。

1つの例では本発明の技術を用いてどの様に結合定数または反応定数が測定されるかが示される。本発明に従う反応物の結合平衡の測定は、少なくとも1つの反応物が化学的に1つの色素分子に結合し、かつ、その反応物の回転拡散速度および/または並進拡散速度が複合体形成の間に変化するという事実に基づいている。もし、平衡定数が非常に希薄な溶液の実験条件と適合しないならば、即ち、

低い結合定数が高い反応物濃度を必要とするならば、このことは例えば大量の非標識反応物を与えるか、または標識化合物に対して過剰の非標識反応物を添加することにより達成しうる。

マグネ(Magne)によって示されたようにFCSを用いた分子揺らぎによる反応速度の測定は、これまで行われてきた測定装置では拡散経路が長いことにより満足

に行うことができなかった。本発明の測定技術を用いることにより、特に生物学的反応に関連する約 10^{-6} s^{-1} 乃至 10^3 s^{-1} の範囲の複合体の解離速度定数の測定が可能となった。このような測定は例えば、蛍光標識分子の相互交換により行いうる。

また、本発明の技術は生物学的高分子の構造変化の測定ならびに関連する熱力学および速度論的定数の測定を可能にする。構造の揺らぎは、例えば回転拡散の測定またはいわゆるエネルギー転移（フェルスター（Förster）理論）により検出できる。

この方法はDNA/RNA 分析にも使用しうる（DNA/RNA 分析については以下参照）。遺伝子解析、特に感染性病原の同定において、診断方法の感度が重要となることが多い。この事は近年特に遺伝子ターゲット配列の増幅を目的とした酵素依存的方法の導入に関連して明らかになってきた。本方法を用いることにより予備的な酵素依存の増幅の必要体を幾つかの診断方法で省略することができ、例えばそれによって強く増幅された単一配列の混入の問題を克服できることが期待される。

また、本方法は既存のRIA、ELISA またはその他の方法（以下参照、レセプタースクリーニング）等の診断法の代わりに使用しうる。本発明の方法の1つの利点はこのシステムが自己校正型であることである。校正曲線または内部標準を施す必要はない。各実験で問題となる分子の測定から内部校正が得られる。例えば、レーザー強度の変化は測定精度に影響しない。連続測定におけるドリフトの問題は発生しない。測定は校正する事無しに何度でも反復でき、同じ結果を与える。装置の校正も省略することができる。望ましい応用にはテスト試薬として抗体を使用しない検定法または抗体を使用したELISA、RIA またはFIA に基づく従来の検定法の代替法が挙げられる。特定のターゲット分子（リガンド）を認識する為

の特異的認識分子（レセプター分子、テスト試薬）としての抗体に加えて、別の分子を使用する全ての検定法が考えられる。一般に、抗体に加えて可能なレセプ

ター分子とはその表面に特定の認識部位を有するか（例えば、抗体、一本鎖抗体、膜レセプター、可溶性レセプター、酵素、構造タンパク質、多糖類、ペプチド、複合体二次代謝物等）またはターゲット分子内に特異的認識部位を含む（例えば、HDL、VLDL、LDL）全ての分子および分子複合体である。

一般的形のレセプターおよび一つ以上のリガンド間の特異的複合体の形成が分析的に興味ある物である場合、および／または少なくとも1つの関連分子が少なくとも1つの色素標識で提供され、かつ、複合体の形成が色素標識の回転拡散および／または並進拡散の変化で明確となる場合、FCS 検定を行うことができる。利点を有する態様に関する同様の熱力学的規則性はELISA、EIA、RIA またはFIA型の検定にも同様に適用しうる（図1 および2 参照）。

本発明の方法の性能は市場に存在する技術と比較したときに特に明確となる。よく採用される方法には関連する装置にいわゆるTDX システムを採用するシカゴのアボット (Abbott) のいわゆるFPIA技術がある。ここでは蛍光標識した分子の偏光解消を同種の検定法で測定している。

偏光での励起後に発せられる蛍光色素の蛍光の偏光解消は、基本的にその分子の分子量、形状パラメータに依存する性質である。大きな分子に比べ比較的小さな分子は励起と蛍光の発光との間により多く回転し、その結果発光のより大きな偏光解消を起こす。この効果は小さい蛍光標識分子が例えば、抗体の結合部位に関し非標識ターゲット分子と競合するような場合に利用される。従って、蛍光の偏光解消は複合体に結合した標識分子の相対的位置に関する情報を提供する。しかし、この方法は望ましい検出限界に到達していないのは明白である。製造業者自身、 10^{-9} Mという比較的低い検出感度を提供している。本発明の方法は至適条件でない時でも2桁以上もこの方法より感度が高い。この事はFPIAキットを本発明に従って使用したときにも正しい。より感度の高い色素を使用することにより、さらに高い感度が達成できる。この事は例えば薬剤診断などの場合に特に重要である。

本発明の方法は種々の試料条件に依存して定量的および定性的検定に特に優れた性能を示す。蛍光の偏光解消度は媒体の粘度／温度条件に依存する。粘度が増

加すると、回転拡散定数が低くなるため全ての分子の蛍光偏光解消度は減少し、直ちに結果に影響する。同様の妨害効果は励起状態の寿命に影響する媒体の条件により引き起こされる。寿命の延長は偏光解消の増加と同様の効果を示す。しかし、本発明に従って並進拡散を測定する方法では、これらの効果は結果の質に重大な影響をおよぼさない。実際に、この事は試料調製およびスケール決定における経費の節約および顕著に大きいダイナミックレンジを意味する。

2. 複合体形成における反応速度の重要性

特異的認識反応を伴う核酸の再生の場合のように（以下参照）、会合速度が遅すぎて認識反応に基づく均一な検定法は实际的ではない。例えば特異的複合体形成の反応速度を増加するために標識抗体を使用する場合の不均一検定法においては反応物を過剰提供し、かつ、複合体に結合しなかった過剰な反応物は次の段階で除去されるが、このことは均一検定法では容易に行えない。

この問題を以下の例で説明する：本発明の方法に従う検出により $\leq 10^{-15} \text{M}$ の濃度の蛍光色素で標識した化合物を測定しうる。もし、蛍光標識した特異的テスト試薬をターゲット分子または分子複合体に使用したなら、少なくとも3つの必要条件が満足されねばならない。1. 複合体に結合していない蛍光標識した分子と結合した蛍光標識分子間のサイズの差は、異なる並進拡散を簡単に検出できるように拡散定数が約2倍異なるくらいに大きくなくてはならない。2. ターゲット分子と複合体を形成する結合定数は十分大きくなければならない。3. 会合の反応速度は実験的に許容しうる分から時間の時間スケールで複合体の形成が行われるように十分大きくなければならない。

もし、複合体に結合していない100個のテスト試薬の内、1つの複合体化したターゲット分子が検出できれば、本発明に従って 10^{-15}M の生成複合体を検出するのに 10^{-13}M のテスト試薬を使用することができる。平衡状態では、対応する2分子会合反応の対応する会合定数 k_{on} が少なくとも 10^3M^{-1} であるならば複合体形成は十分効率よく起こる。このような高い結合定数はタンパク質のような生体分子では殆どありえない。通常抗体の結合定数は 10^6 から 10^{10}M^{-1} の範囲に

ある。

生体分子の複合体化反応における抗体の反応速度定数は $k_{a,s,s} = 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の範囲を越えることはまず無い。基本的に結合定数の差はしばしば 10 から 10^3 s^{-1} の範囲にくる複合体の解離速度定数 $k_{d,s,s}$ の差に寄因する。しかし、上述の場合、 $k_{a,s,s} = 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の速度定数はテスト試薬の濃度を 10^{-10} M としたときに会合の寿命が 1000 s 付近になることを意味している。

本発明に従って、低い結合定数にもかかわらず認識反応の均一検定法で 10^{-15} M にも達する光学検出反応の感度を利用した幾つかの代替法が考えられる。

反応条件を変えることにより会合定数を極端に変化させることができる。核酸について、相補的核酸配列の会合がどのように $10,000$ から $100,000$ 倍も加速されるかを以下に説明する。長い鎖状DNAの配列モチーフの認識反応は純粋な拡散支配の反応よりも速く進行する。おそらく律速段階はDNAへのタンパク質因子の到達であり、その後実際の結合部位への速い一次元拡散段階が続いている。

一般に加速は会合の律速段階の拡散過程を短くすることで達成しうる。このことは単純に反応混合物を濃縮することにより行われる。

本発明では均一検定法において媒体の条件を変化させ、試料容積を減少することなく効果的に反応分子の滞在空間を減少させている。本発明では、基本的に水和水被覆の構造に影響を与える例えばポリエチレングリコール類、デキストラン、ポリビニルピロリドン、カオトロピック試薬類、有機溶媒またはこれらの組み合わせ物を添加することで行っている。本発明では水性2相系を用いて1相に選択的に反応物を濃縮している。

別の可能性として標識した反応物の過剰量の使用が挙げられる。もし、共同して1つの分析物を認識し、結合する2つの色素標識した反応物を使用すると、いわゆるエネルギー転移複合体が形成される。1つの色素標識は発光した蛍光が隣接する第2の色素分子 ($10\text{--}100 \text{ \AA}$) を励起する励起光受容体として働き、第2の色素から発した蛍光が本発明の測定シグナルとして検出される。エネルギー転移は色素間距離の6乗に比例して減少するので、反応物は過剰に使用しうる。3者複合体の並進拡散定数を本発明に従って測定する。

本発明では、もし、非複合体化テスト試薬が化学的にまたは照射により分光学

的に変化を受け、複合体とは異なる分光特性になるならば、過剰成分としての色素標識テスト試薬の使用も可能である。この事は例えばインターカレーション(intercalating)色素の場合に可能である。

本発明の電氣的トラップによる濃縮については本明細書の別の箇所で説明する。

もし、例えば小分子に対する標識化抗体の使用の場合などのように複合体形成がテスト試薬の分子量および／または形状をわずかにしか変化させないならば、本発明の複合体に対する過剰の第2の抗体の使用は本発明で検出する第3の複合体の生成を可能にする。

本発明に従って少なくとも一つのターゲット分子と反応できる、少なくとも二つの異なる色素で標識された少なくとも二つの異なるテスト試薬であって、少なくとも二つの色素の蛍光シグナルを本発明に従って測定する試薬も使用することが出来る。この方法は二つの様式で使用する。

a) 試料における少なくとも二つの分析物の同時測定

一つの試料中に存在する複数の分析物を検出する上で実験的問題がしばしば生ずる。二つの独立する検定法とは異なり、少なくとも二つの異なる分析物の検出は二つの独立する異なる色素で標識し、望ましくは異なる波長の光で励起するか、もしくは異なる発光波長の光を独立に検出できる二つの独立するテスト試薬の反応により本発明に従って独立に行うことができる。このことは、たとえば図16に図示した二つの独立する光学系を用いて行いうる。

3. 相互相関

b) 一つの分析物に少なくとも二つの異なるテスト試薬が同時に結合することによる検出特異性の向上

一つのテスト試薬を結合することにより、不十分な特異性しか有さない場合でも類似の分析分子から特定の分析物を区別することができる。このことは自分自身の病原性またはそれらの生産物の病原性など、その生物学的活性が極端に異なる相同的核酸配列で例示される。腫瘍抗原、構造蛋白質または細胞型特異的表面マーカー等の蛋白質も分析するが、唯一のリガンドの結合だけでは不満足である。

本発明に従い、特定の分子は、少なくとも光学的に異なる蛍光分子で標識した少なくとも二つのテスト試薬と同時に複合体を形成しうる。本発明に従い同時の複合体形成はエネルギー転移複合体の形成（フェルスター転移、上述）または異なる波長を有する励起および／または発光のシグナルの生成を通して特異的に検出しうる。一つの分析物に対する異なるテスト試薬の結合は異なる光学シグナルの時間相関で確認される。

二つの異なる標識を付されたテスト試薬による分析物の二重複合体化は、上述の特異性の向上という利点ばかりではなく、各試薬をより高い濃度で使用するという実際の利点もある。本発明に従い検出される蛍光シグナルの時間相互相関により、非標識の遊離テスト試薬のシグナルは電氣的シグナル処理のレベルで効率的に抑制しうる。この方法は分析物の異なる配列断片に結合する少なくとも二つの異なる標識テスト試薬を使用することによる核酸分析物の場合に特によく使用される。異なる色素からの蛍光の発光波長は異なる。通常測定される検出シグナルの単一の自己相関の代わりに、本発明では異なる波長のシグナルの相互相関が測定される。もし、両プローブがターゲット分析物に同時に結合するならば、相互相関で分子の数および二重標識核酸断片の拡散時間が分かる。結合しなかったプローブ分子は自己相関では見えてくるが、このシグナルは相互相関では抑制される。

4. 蛍光相関顕微鏡法を実施するための方法および装置

このように本発明に従い分子または分子複合体に化学的に結合または物理的に会合した異なる色素の蛍光シグナルの相互相関を用いて感度および特異性を向上することが出来る。しかし、至適手順で実験するために以下に示す本発明の方法ならびに関連する装置により特に有効に実施しうる幾つかの必要条件が満足されなければならない。

本発明の方法は小容積エレメントを用いる蛍光相関分光法と相互相関法を組み合わせている。この方法はFACS分析(蛍光活性化細胞分別)で使用されている相関法とは明らかに異なる。そこでは細胞の様な大きな複合体に由来するいくつかの光学パラメータ、例えば蛍光シグナルと前方散乱光の組み合わせ、または異なる蛍光シグナルが同時に測定されている。セルソーターの場合、単一細胞を含む

単一液滴のシグナルが測定される。細胞型またはサブタイプを同定するためにとるシグナルの相関は液滴から検出される種々のシグナルの強度分布のみを問題にしている。相関は各強度に関する幾つかのパラメータの平行した検出と考えてよい。ここで示している方法は二つのストカスチック過程、小空間エレメント中の種々の発色団の拡散特性を時間とリンクさせている。実際に細胞のレベルでは、本発明の方法は発色団を有し測定領域に存在する種々の分子を区別しうるが、セルソーターでは、発色団が小分子の一部であるか、または複合体として存在するか、または細胞に結合しているかにかかわらず、液滴中の発色団の濃度を総合的に検出するにすぎない。

FCS 分析と組み合わせた相互相関とは以下の方法論を意味している：容積エレメントは出来るかぎり強く絞ったレーザー光またはX線で照射される。その電磁波照射の強度は照射によって励起されうる分子の大部分が励起状態に励起されるのに十分な大きさを有するように選ばれる。それから発せられる蛍光を単一光子測定装置のピンホール開口による共焦点像で検出することから、非常に小容積の細長い円錐形の光を測定することになる。この測定容積エレメントに分子が拡散してくると、励起され、この測定容積エレメントに留まるかぎり発光によって測定される。その平均滞在時間は分子、分子複合体または細胞の大きさおよび形に特徴的なものとなる。

このように種々の濃度で存在する分子は相関分光法で区別でき、また同時に計数しうる。例えば、レセプター／リガンド相互作用等の複合体形成の結合定数又はこのような複合体の衰退速度などの速度定数をこのように測定しうる。この方法では特に蛍光性を有する分子が単位時間当たり、容積エレメント内に僅かしか存在しない場合に良好な結果を示す。この事は 10^{-9} 以下の濃度範囲の場合に相当する。しかし、逆に第2の反応物との複合体形成は $10^7/s$ よりも速く進行することは無いという問題が生ずる。2つの反応物が 10^{-9} で等モル存在したとすると反応時間は1分以上かかることを意味する。この反応時間を短縮するには、例えば過剰量の蛍光標識反応物を使用することで達成される。反応物の濃度が $10^{-9}M$ の場合、 $10^{-12}M$ の濃度のターゲット分子との複合体は分単位の反応時間の後に検出しうる。より低い濃度の場合、複合体と遊離のリガンドとのSN (シグナル・ト

ウー・シグナル) 比が大きくなりすぎて信頼できる濃度測定は出来ない。もし、測定すべき複合体の結合定数がリガンド濃度 $\leq 10^{-9}$ にするほど高くない場合にも別の実験的問題が生ずる。しかし、ウイルス抗原、病原体の核酸または特定のホルモンは有意に 10^{-9} M以下の濃度で検出しなければならない。典型的な応用分野はしばしば低い結合定数を有し、各分化した細胞の抗原から脱分化した細胞の腫瘍抗原を区別する上で特異性がそれほど高くないモノクローナル抗体で腫瘍抗原を診断する場合である。2つの異なる発色団を用いた相互相関法で上述の感度および特異性の向上が可能となる。

少なくとも3個の発色団を有する分子または分子複合体が実験的に区別される必要がある：発色団1を有する遊離リガンド、発色団2を有する遊離リガンド、発色団1を有する複合体、発色団2を有する複合体並びに発色団1および発色団2を有する複合体。測定容積内に複合体が存在する時間内に発色団1および発色団2を有する複合体のみが、腫瘍抗原またはウイルスまたは関連するDNAまたはRNA等の病原体として検出すべきターゲット分子となる。

ここでの相互相関法では発色団1および発色団2が相関している。分子複合体が測定容積内に存在する1つの同じ時間枠で励起される場合にのみ、両タイプの発色団が検出され、これらのシグナルが両発色団を有する複合体として認識される。

相互相関法を成功させるための重要な必要条件は：

－ ターゲット分子上の発色団1および2の距離は測定容積の寸法に比べて十分小さく、その結果分子が測定容積に侵入し、再び出ていく間に測定の誤差範囲で両色素が同時に励起光で照射されなければならない(複合体内での距離 $< 0.1 \mu\text{m}$)。

－ 両色素に対して測定容積が同じ大きさとなり、互いに結合している両色素は同じ時間枠内で励起光に照射されなければならない。

－ 両測定容積は測定の誤差範囲内で同じ空間位置を占めなければならない。

この問題を解くことは些細な問題ではない。例えば、1つの問題は、良く知られているように異なる波長の光は屈折率の違いから異なるサイズの像を結ぶことにある。しかし、波長の異なる2つのレーザーが不均等な絞りにより不均等な大き

さの測定容積を照射したり、またはフォトマル上での検出が異なる測定容積をカバーしていたならば測定にとって障害となる。

本発明ではこの問題を少なくとも2つの発光波長のいわゆるストーク・シフトによって区別しうる強い重なった励起スペクトルを有する2つの色素と1つの励起波長を有する1つのレーザーを組み合わせることで解決している。それとは別に、同一の空間位置を有する容積エレメントが2つの独立するレーザー光源で照射されることもある。簡便性のため、共焦点光学系は両方の場合で色補正、即ち両発光波長に対して補正されて、両波長に対して1つで同じ空間エレメントが測定されることになる。

本発明では異なる波長の蛍光を結像するのに、同じスケールで異なる波長の光を結像しうる顕微鏡で馴染みの深い結像光学系を使用している。しかし、また、本発明の方法の性能にとっては、同様の大きさの測定容積、同様の強度特性、および両波長で照射される同様の空間的位置が重要である。本発明においてこの事は異なる強度を有する2つの調整された固定光学系を使用し、結果的に両波長が光線が同じ大きさおよび位置に予め絞られる励起光学系側の装置、または固定的に調整された予め絞るための光学系を第2光線経路の可変光線拡大素子と組み合わせた装置を用いること、または両光線経路で予め絞るための可変光線拡大素子を採用することにより達成される。

簡便のためこの装置は2つの対物レンズが照射される測定部分の2つの反対側に位置するコンパクトな二重顕微鏡で実現される。入射光および測定部分の分子、分子複合体、ベシクル (vesicles) または細胞から発せられる光線のための光学系は2つの顕微鏡の各「部分」の共通するガイドまたは支持装置の両側に配置される。各入射光はダイクロイック・ミラーで対物レンズのほうに反射される。帰ってくる光線はこれらのダイクロイック・ミラーを透過しレンズ、共焦点素子およびフィルター等の種々の光学素子を通過した後に検出器に到達する。

簡便のため、二色性 (dichroic) ミラー上に差し込む光線の光学軸は2つの対物レンズの移動方向に対して直角に配している。重なった異なる波長の2つの光線は光線経路中の最初のものが二色性ミラーである並んだ2つの鏡にぶつかる。

2つの光線の内の1つはこの二色性ミラーで反射するが、もう一つの光線はこの二色性ミラーを直線的に透過し、第1光線とは反対の方向に後ろの鏡で反射され

る。両光線の反射方向は対物レンズの移動方向に平行である。さらに、両反射光は反射または二色性ミラーで反射され、入射光の光学系を通過していく。二重顕微鏡の光学素子のこのような配置は、測定部分に入り、そこから進んでいく光線の光学系に沿った2つの対物レンズはそれらに沿った光源を除去または移動することなしに取り除くことが出来るという利点を有する。特に、レーザー光源などの光源は二重顕微鏡から離して設置する事が出来る。光源と2つの光線を重ねて、かつ供給する二重顕微鏡の間の相対的位置を変える必要がない。

また、全 4π 固定角に渡る測定容積からの蛍光シグナルをカバーする必要がある場合にこの装置を使用することができる。特に、この事は単一の分子の検出に於いて全ての発光光子を検出することが重要である場合に起こる。この場合、上述した装置は1つだけの励起波長だけが使用され、両方の検出素子は一緒になって全 4π 固定角をカバーするように使用される。

第1図はリガンドLに特異的な結合性を示すレセプターを有する細胞を用いた関連するエフェクター分子のレセプター検定法を示している。リガンドは本発明に従って色素標識したものが提供されている。本発明において、レセプターおよびリガンドのモル比および全濃度は約50%のレセプターが結合し、約50%のレセプターが未結合でいるように選択される。本発明に従った分析において、この事は遅い並進拡散分子から検出されるのと約同数の発光シグナルが速い並進拡散分子から検出されることで見て取れる（右上の模式図；左のステップは遊離リガンドに対応し、右のステップはレセプターに結合したリガンドに対応する）。

活性物質が添加されたとき、平衡の移動は特異的レセプター結合を有する活性物質候補の相互作用を示す。レセプター機能のアンタゴニスト活性化因子または阻害因子の場合、標識リガンドの置換が観察される（シグナルは遊離リガンドのみのシグナルに対応する）。同様のシグナルは、レセプターまたはリガンドとの活性物質のアロステリック相互作用が標識リガンドの結合を妨害する場合に見られる。

同様に、活性物質はレセプターへのリガンドの結合を促進し、結合したリガンドの測定値を増加する（右下）。

また、この検定法は細胞が観察される特異的反応を妨害しないレセプターをより多く有している場合にも行いうる。

もし、レセプター認識反応が迅速に平衡に達しないならば、標識リガンドおよび活性物質をレセプターに対して同時に競争させうる利点がある。

第2図は同じ特異性および結合強度を有する天然のリガンドを認識するが異なるシグナルを伝達する異なる細胞上の異なるレセプターの使用について説明している。活性物質はこれらのレセプターを選択的に活性化または妨害することで興味深い。この事は天然の活性物質の変異体と同様に構造的に関連しない活性物質でも行いうる。

例えば、先ず各ターゲット・レセプターに対する検定を別々に行う。第1図の脚注に示した規則を適用する。基本的に、活性物質を効果的におよび特異的にレセプター結合の1つと相互作用することについて、従って種々のレセプター機能の区別が可能であるかどうかを検定する（左下に可能な場合を示した）。同様の方向に作用する効果で、右下に示したような測定結果が見て取れる。

特異的实施例により、以下に詳しく示すように、本発明のFCS 検定法は抗体に依存する特異性に限定されず、均一または固相検定における分子、細胞、組織系に対して等しく有用であり、熱力学的パラメータ（結合定数）および速度パラメータ（速度定数）の測定が可能であり、生体系（細胞培養物、組織）の非破壊研究が可能であり、および溶液中で分析する場合に表面との非特異的相互作用が妨害しない点で優れている。

5. 細胞または天然または人工的ベシクル構造に存在する未知のレセプターに対する既知の蛍光標識リガンドの結合による医薬活性物質のスクリーニング

天然物と同様に化学的に合成された医薬活性物質は未だ知られていない標的分子として存在する。これらの標的分子には細胞外分子（例えばプロテアーゼ・インヒビター）、表面膜レセプター（例えばインシュリン）、可溶性メディエーターレセプター（ステロイドホルモン・レセプター）または細胞構造タンパク質

または酵素として存在する。

従って、本発明により既知の活性物質の医薬的に重要な標的分子を発見し、特徴付け、場合によってはこれらを単離する非常に重要な問題が解決される：

- オルファン (orphan) ・ レセプターの探索
- 医薬作用のメカニズムの解明
- 活性物質類似体の探索
- 望ましくは区別しうる生物学的標的における (種々の細胞分化、腫瘍／非腫瘍、病原／非病原等) 種々のレセプター分子の差異の探索。

医薬速度論

本発明にしたがって医薬速度論に関する研究もなしうる：

- 特定の活性物質の投与後種々の時間間隔で新たに添加される色素標識比較物質を用いた競争実験で組織試料または体液を分析しうる。

複合体の解離速度定数による活性物質の標的分子の区別

もし、過剰の色素標識活性物質をレセプターと活性物質の種々の複合体混合物に添加したなら、活性物質の解離分子は色素標識活性物質と置換するであろう。場合によってはこの実験は逆標識でも行いうる。例えば、典型的な問題は異なるレセプターを検出する為の種々の細胞系列の分析にある (例えば：腫瘍表面抗原、タンパク質P 結合型レセプター I、II、III)。一般に、多くの試料を同時に分析する場合、第19図に示したような図ができる。本発明に従って、解離速度定数が小さい場合、固定時間間隔であらゆる位置で反復して結合および解離活性物質の比を測定する事により同時に、および／または反復して長い期間に渡る実験で非常に多くの分析物を分析しうる。第19図にこの結果を図示してある。

このように、例えば1つで同じ試料中、または解離速度 (k_d) は非常に異なるが反応速度定数 (k_r) は同等である種々の細胞型または分化段階を含む種々の試料中の特異的標的分子と種々の熱力学的安定性の複合体を形成する種々のレセプターまたは抗原決定基を検定しうる。従って所謂オルファン試薬またはオルファンレセプターまたは多機能分子群のメンバーに関する生物学的構造も機能検定法で検出しうる。

実際に取り扱う上での利点は均一溶液での作業が、nmレンジのルーチン分析において実際には無視できる程の（秒または分のレンジ）短いインキュベーション時間に由来しており、かつ激しい洗浄ステップまたは二次インキュベーションの必要もない。

試料キャリアーとしては本発明にしたがって対物レンズに液体試料を接触することなく、従って汚染されることなく近づけうるシート状キャリアーを使用することが望ましい（第3図）。

第3図は例えば特許出願PCT/EP 89/01320、PCT/EP 89/01387、PCT/DE 91/00082、PCT/DE 91/00081、PCT/DE 91/00083、PCT/DE 91/00704 に説明され、使用されている様なウェルを有するキャリアーシートの使用が示されている。マルチ・ウェル・シートと呼ばれるこの反応キャリアーは本発明のFCS 分析のための試料を受容しうるウェルを有している。これらは二次元的に移動可能なシート挿入装置で制御され、試料を含むウェルの底が対物レンズに接近し、その結果液体試料部分は対物レンズから約100-1000 μm よりも離れることはない。シートと対物レンズの間の媒体は水が望ましく、これには対物レンズの補正が関係している（上述参照）。そのシートはレーザー励起光および発光の両方に関して光学的に透明で化学的に不活性である。シートはカバーシートでシールされていることが望ましい。市場に出回っている自動ピペットシステムが使用できる点で、市販のマイクロプレートシステムまたはオカサキフォーマットに対応するウェル間距離を有するシートが望ましい。さらに、反応キャリアーとしてのシートは汚染が低く、簡単に廃棄でき、かつシール状態でコンパクトに納めうるものである。

6. イオン性分子の分析

「電氣的トラップ」を採用することにより本発明の方法の測定領域内で荷電分子（カチオンおよびアニオン）を特異的に分析しうる。この事は、例えば機械的誘導流による誘導の有無に係わらず特定のイオン性分子を観測部分に電場で濃縮するか、または単一の分子を測定領域に直接輸送してくるような、測定領域に分子流を誘導する事により行いうる。このことは静電場、例えば約1V/1 μm の範囲の電場強度を有する2つのキャピラリーの末端間で行いうる。本発明に従って、

1つ以上のトラップ分子が観測部分に入るやいなや観測領域内の電場内で該分子を振動させることもできる（以下参照）。

本発明の装置の技術的な説明

7. 光学系

本発明の方法は技術的には焦点の結像特性に関して高い性能を有する顕微鏡光学系を用いて行いうる。特に、励起光の発生前のレンズ系は色的にも構造的にも補正したものでなければならない。高い開口数1.2N.A.以上を有するドイツ、オーベルコッケン、ツァイス社のNeofluarシステムが望ましく、カバーガラスまたは分離コート無しでも使用しうる。作用距離は0.17-0.9mmである。対物レンズは水に対して補正してあり、最高作用距離で最高の開口数を提供する。油浸対物レンズは適していない。本発明に従い、光量は顕微鏡対物レンズの後ろにある対物板にある共焦点ピンホール開口で制限される。

8. レーザー光源

>200-1000nmの波長のレーザー光源として、特にアルゴン、クリプトン、ヘリウム-ネオン、ヘリウム-カドミウム並びに可変ダイオード・レーザー（赤から赤外線）など周波数ダブリングの可能性を有する連続レーザーを使用するのが望ましい。本発明に従って $\geq 10\text{MHz}$ の高周波数パルスレーザーも使用しうる。

9. レーザー強度

0.5mWのレーザー強度で観察容積内の色素分子の数パーセントを励起するのに十分である。5mWのレーザー強度では励起分子の割合は50%となる。さらにそれ以上レーザー強度を上げるのは光効率から見て適当ではない。

10. 化学発光団

結合するのに適した化学発光団または蛍光色素には、蛍光分光学的検出法において長時間使用しうるような多くの基本的色素構造物並びにそれらの色素のオリゴマーがある。色素としては標的分子との特異的な妨害相互作用に寄与せず、またはP 42 34 086.1（ヘンコ(Henco)等）に提唱されているように、核酸二本鎖にインターカレートしうるような特異的結合性を利用して特異的に使用しうる色素が望ましい。

使用する色素は量子収率0.1-1 で吸光係数が約30,000から100,000 のものが望

ましい。

例えば疎水相互作用を防ぐように親水性残基を多く含むクマリン類またはローダミンB誘導体由来の色素、または二本鎖中にインターカレートしうるチアゾール・オレンジ基本構造に基づく色素が適していることが分かった。

本発明の測定法に関して、光消光（光安定性）に対する色素の耐性は重要なことである。しかし、先に述べたように、本発明に従って非常に小さい容積が使用される場合、測定時間は約1000倍大きい領域を測定する場合に比べて数桁短くなることから、測定性能に関して傑出した重要性を有するとは言えない。

11. 三重項状態の意義

本発明では、色素は三重項状態を生成しないほうが望ましい。

色素を選択する場合、三重項状態を生成しにくい色素を選択することが重要である。三重項状態は化学反応の確率を増加し、シグナルを提供しないか、または不都合な波長のシグナルを提供し、かつ、分子が再び励起される状態の一重項状態に戻るまでの時間を長くする。

もし、標識するのに色素多量体、特に特定のクマリン誘導体のような親水性色素に基づく色素を使用するなら、測定時間を有意に短くする事ができる。各測定容積の数が多くなれば、少ない分子の測定領域の通過で十分な測定精度を得なければならないことになる。

12. 測定部分

第4 図にみられるように、測定部分はレーザー絞リ光学系の対物レンズから10 0-1000 μ m まで接近していなければならない。最も単純な場合、この事は対物レンズ自体へ垂らし、分析する分子を含む液滴で行われる。このような測定システムは種々の試料間の汚染の可能性が高くなることから分析物が少ないときに限られる。カバーガラスおよび油浸を用いる従来の顕微鏡に相当する技術も使用しうる。本発明の方法は光学系から水性試料を離すのに水浸および非常に薄いガラスまたはプラスチックシートを使用している。このシートは同時に平たいキャリアーまたはキャピラリーの形で測定部分の下をシールするのに役立っている。

多くの生体高分子の進化的至適化の実験で起こるような大量の試料をスクリーニングする目的では試料に向いた側を化学的に修飾したメンブレンも使用される。望ましい修飾とは例えば核酸を固定ためのイオン交換性などの特異的結合性、および／または抗体コーティングおよびキレート試薬特にNTA(ニトリロ三酢酸)またはIDA(イミノ二酢酸)によるコーティングなどのタンパク質に関する特異的結合性を有し、標的構造に対する相互作用でこれらを分析するために高い結合定数 ($k_{ass} \geq 10^4$) で金属キレートを介して表面に結合しうる(His)₆などの結合オリゴペプチドを含むペプチドまたは組み換えタンパク質を選択的に固定するための表面構造である。

13. 分子トラップ

小容積エレメント内の単一分子の検出の可能性には、本発明に従い後に示される電場を用いた分子トラップの使用がある。この種の分析は荷電分子などの電場と相互作用する分子に対してのみ使用しうる。

14. 検出

測定シグナルの検出はなだれ(avalanche)・ダイオード検出器の使用が望ましい単一フォトン計数器を含む蛍光顕微鏡の光学系で行うことが望ましい。例えば、EG & G社のSPC-100 およびSPC-200 を使用することが適当であることが分かった。シグナル分析はデジタル・コリレーターまたはマルチチャンネルカウンターMCSを用いて行う。

方法および応用

15. 分子の特性

相関法は直接3個の分子的特性：数(N)、並進拡散定数 D_t および回転拡散定数 D_r を明らかにする。後者の2つは分子の大きさと形（例えば半径、形および容積）の関数であり、例えば酵素的切断または他のリガンドとの複合体の形成による分子の変化に関する情報を提供する。拡散に相関する拡散時間の測定も本発明に従って迅速かつ高感度を実施されるので、分子サイズの分析および溶液中の

分子集団の分布の分析はクロマトグラフィーによる分離なしに本方法で行いうる。

16. 結合定数の測定

R.リグラー(Rigler)が示したように、互いに反応する分子の相関関数の分析により、その相互作用が分子数 N および特徴的拡散時間の重み付け因子を測定することで決定しうる。特異的反応の場合は常にそうなるが、反応速度定数の値が拡散時間よりも小さい場合、相関関数は重み付けした拡散時間の総計で与えられる：

$$G(t) = 1 + 1/N (X (1 + t/\tau_x)^{-1} + Y (1 + t/\tau_y)^{-1})$$

ここで X 、 Y および τ_x 、 τ_y は分子 X および Y の割合および拡散時間である。 $\tau = \omega^2 D$ 。 ω は試料容積の半径であり、 D は拡散定数である。

反応速度定数が拡散時間よりも大きい場合、相関関数は

$$G(T) = 1 + 1/N (1 + 4 \langle D \rangle t / \omega^2)^{-1}$$

ここで $\langle D \rangle = xD_x + yD_y$ 。

もし、 D_x および D_y が異なり、レセプターとしての大きい分子（タンパク質、核酸、抗体）に対する小さいリガンドの結合は通常所謂不均一検定法で行われる分子分離過程無しに簡単に行いうる。また、相当する関係も回転拡散係数又は回転拡散時間も誘導しうる。高い測定感度はラジオイムノアッセイ技術(RIA)として知られているラジオアイソトープの感度を越える。これらは高い比活性で標識したときのみ同様の効果を示す。本発明に従って遂行したときは、分子分離過程および煩雑な校正を省くことができる。従って相関法は今日使用されているラジオイムノアッセイの代替物となりうる。以上に示した技術に従い、均一相または不均一相（固相に結合して）において測定すべき抗体と拮抗させて抗体への結合を分析する蛍光標識抗原を放射能標識した抗原試薬の代わりに使用することができる。本発明の方法の利点の1つは測定法の感度を同時に増加できる一方で望ましくない放射能を排除しうることに基づく。

17. 酵素反応の生成物

酵素触媒が分子構造および分子量を変化させる場合、反応生成物の形成は分子

数および拡散時間の変化をもたらしうる。典型的な例には核酸の複製および切断、タンパク質およびペプチドの切断があるが、触媒抗体の選択も挙げられる。

18. メンブレンおよび細胞における分子動力学

FCS 法を用いた粘性環境下での大きな分子の回転拡散を測定できるということは細胞表面ばかりでなく、細胞内部での特異的レセプターの動力学の解析にとって特に重要である。同時に、標識したリガンドの結合はレセプターなどの細胞構造物のところでの回転拡散および並進拡散を測定することで決定しうる。例としてはニューロトランスミッターや成長ホルモンなどの組織因子ばかりではなく Ca^{+2} 等のカチオンリガンドも挙げられる。

また、本発明の方法は揺らがないか、または非常にゆっくりと揺らぐ分子に対しても使用しうる。このことは、例えば非常に粘性の高い媒体中、ゲルマトリクスまたは組織中、固相を使用して、または非常に大きな分子複合体または細胞を用いて測定する場合に対応する。

意外なことに、質量が大きいにも係わらず細胞でさえ水性懸濁液中で測定しうる。ブラウン運動および攪拌は、例えば測定容積内にそのレセプターを有するメンブレンを導入し、かつ色素標識の消光減少を介在することなしに再びそこから出ていくのに十分な効果を有している。図式で示した第5図は、本発明にしたがったほぼ定常状態の分子測定を示している。例えば、長方形で示されているように、それらは固定化細胞上のメンブレン・レセプターとして存在しうる。座標軸は本発明に従った定常状態の測定容積の強制相対運動による非揺らぎ分子の分析を示している。これはレーザーの座標、測定容積の座標、または試料の座標の相対的変化、またはこれらを組み合わせることにより行いうる。

揺らぎが強く制限されるか、または色素標識が定常的に結合している場合、本発明では測定容積に対する揺らぎを強制しなければならない。この事は試料容積およびそこに含まれる測定容積の強制運動（例えば振動、流れ）および／または試料内の測定容積の位置座標の連続的または非連続的变化によって行う。この事は焦点を変えること、および／または照射される容積エレメントの位置を変化することにより行うことが望ましい。固定化標識分子の場合、このように強制され

た測定容積の位置座標に対する相対運動は、結合色素の「見かけの」並進拡散を決定する。非固定化分子に結合する色素分子を区別するために、強制相対運動は

非固定化分子の運動よりもゆっくりしていなければならない。

本発明で示した操作はゆっくり拡散する複合体の並進拡散の時間が分析には関係せず、むしろそれに結合した色素標識の絶対数または相対数が重要である場合に可能となる。このことは、例えば細胞培養物または組織のレセプター結合定数を測定する場合に相当する。

本発明の方法で特に利点を示すのは分子および／または細胞運動の測定である。このような測定は技術的、生物学および医学的に興味深く、また、まだ広まっていないような特殊な技術を使用することによってのみ可能となる。本発明に従った実施例を以下に示す：受精能力測定に関する精子の運動の測定、マクロファージの運動、収縮要素の活性、天然または人工膜中の膜タンパク質の運動、活性または能動輸送分子の運動。このことは細胞、分子複合体または問題の分子を標識抗体または抗体誘導体などの特異的色素標識リガンドで標識すること、または色素標識で直接標識することによって行うことが望ましい。

本発明の1つの重要な利点は、とりわけ細胞または天然または人工ベシクル構造体上に存在する既知のレセプターへの既知の蛍光標識リガンドの結合による活性物質の薬学的スクリーニングの可能性にある。現在、レセプター結合活性物質の探索における研究の望ましい方向には、第1にプロテイン・キナーゼ・レセプター群などの特定のレセプターのクローニングおよびそれらを個々に発現する事が含まれる。ついでこれらの標的構造を例えばELISA プレート等に個々に固定化し、ELISA 検定法を用いて分析する。これを行うためにはかなりの量の研究能力および人員が必要とされ、かつ、クローニングされ、個々に発現されたレセプターがその機能または特異性を変化または喪失する危険が伴う。

第1 図および第2 図に見られるように、本発明ではレセプターのクローニングを完全に省くことができる。レセプターは特異的リガンド相互作用に関する相互の結合定数の範囲内の濃度で使用しなければならないので、細胞または天然またはクローニングした細胞の断片を使用することができる。また、このことは高い反応物濃度で起こりうる他のリガンドまたはレセプターとの非特異的相互作用の

危険を抑制しうる。従って、他のレセプターの存在はこの検定を妨害しない。

単一の標識リガンドを使用する検定で種々の細胞／細胞系列を使用する場合、レセプターの機能的挙動の差も結合リガンドの変異体との競争を通して区別する。異なる組織における1つで同じエフェクターに関して区別されたレセプター機能は稀に起こる調節メカニズム（例えば、TNF、キニン）ではないように考えられる（第2図参照）。この効果は1つのレセプター型を認識する選択的リガンド変異体を使用することにより薬学的に用いることができる。

第26-28図は、

(i) 細胞外膜のレセプターとの会合に関する蛍光標識したリガンドの挙動の測定、

(ii) 結合および遊離リガンドの区別、および／または

(iii) 細胞質ゾル中を通過する場合のリガンド運動の測定、

に関する本発明に従ったFCS法の応用を示している。

また、(i)乃至(iii)のテーマは、とりわけ標識分子種の運動の三次元的イメージ化を行いうるダイナミック・レーザー・スキャンニング顕微鏡法において本発明を応用する例となる。得られる特定の分子濃度の分布から、この分子の局在化に関する結論が引き出される。また、この方法は例えば区画化された標的分子との会合（例えばウイルス核酸とのセンス／アンチセンス相互作用）等の各細胞または組織区画中の分子状態の評価を可能にする。

(i)乃至(iii)はラット由来の細胞結合レセプター（EGFレセプター）とヒトの上皮成長因子(EGF)で例示される。EGFレセプターを有する細胞は各腫瘍組織に由来するラット膀胱細胞NBD2である。この細胞をPBS（リン酸緩衝液）中シャーレ上に表面固定化する。これらを集密化単層に到達するまで標準培地で増殖させる。培地にはテトラメチルローダミンで標識したEGFが含まれている。励起用には500 nmのアルゴンレーザー(0.5mW)が選ばれた。遊離のEGF因子の回転拡散定数 (τ_{offree}) は0.145msである。その濃度は6nMであった。第26a図は遊離EGFの自己相関関数を示している。

細胞単層との30分間のインキュベーションの後、測定容積が細胞外膜を含む場合第26b図に見られる自己相関関数が見られた（第5図参照）。測定で検出され

たりガンドの88%は関連する拡散時間 $\tau_{\text{complex}}=14.54\text{ms}$ を持つレセプター結合複合体中に存在する。この時間は細胞膜中のレセプターの拡散に係る量である。拡散時間 $\tau_{\text{free}}=0.145\text{ms}$ にはリガンドの12%が含まれている。1つの空間要素中には約1つのEGFレセプターが存在する。関連する膜表面は $0.5 \times 10^{-8} \text{cm}^2$ である。30分間の洗浄後、第26c図に示される自己相関関数が見られ、そこから以下のことが見て取れる：測定容積当たり約0.5個のEGFレセプターが高い親和性で結合しているリガンドを保持している。

もし、FCS測定容積が少なくとも大部分が細胞の細胞質ゾル内に有るなら、第27図が得られる（細胞質ゾル中のEGF）。進入したEGFの38%は移動中に妨害を受け（レセプターへの結合または粘性の高い媒体の影響による）（拡散時間 $\tau=3.3\text{ms}$ ）、またEGFの62%が遊離因子と同様の移動度を有している。

第28a図はM13/pUC(-21)プライマー（5'-TGACCGGCAGCAAATGT-3'）の配列を有するDNAオリゴヌクレオチドと対応する相補的配列を含むバクテリオファージM13のウィルス一本鎖DNAとの相互作用を示している。このオリゴヌクレオチドは5'-C₆位置にボディパイ（モレキュラー・プローブ社）で標識してある。会合反応の時間経過は40℃の溶液中、本発明に従って測定された。この溶液には10nMトリス緩衝液（pH7.5）および0.18M塩化ナトリウム中の50nMのオリゴヌクレオチドおよび50nMのM13mp18(+)DNAが含まれている。連続的自己相関関数の変化は会合の速度論を明らかにする。自己相関は、0、0.5、1、2、4、8、16、32、64、128、192および256分後に測定した。遊離プライマーの拡散時間は0.17msであり、複合体形成後には2.9msであった。第29図は会合した複合体中のプライマーの割合を実験的に明らかにする会合経過を示している。再会合速度は 0.07min^{-1} である。

第28b図は標識したプライマーDNAの自己相関の例である。第28c図は遊離およびM13DNA結合プライマーの混合物の自己相関関数を示している。

測定領域の細胞は、インサイチュウ(in situ)および基本的に非破壊的に分析できる。特にこの事は薬学速度論的研究に関連する。

19. 反応速度パラメータ

秒の単位の拡散時間を測定できることは、高い会合定数の2分子の速度論的相互作用の解析および再結合および解離速度定数の測定を可能にする。この事は抗原/抗体、リガンド/レセプターおよび同様の相互作用などの高い生物学的特異性を有する相互作用の特性に対して特に興味深い。 10^{-6} s^{-1} 迄の定数を有する特に遅い過程の解析は本発明に本質的な自己校正の利点により簡単に行われる(第19図)。

20. 単一分子の検出

高感度の本測定法により少なくとも1つの検出レーザー光を通過する単一の分子が観測される。 $\leq 1 \mu\text{m}$ の出口を有する特別なガラスピペットの形をしたいわゆる「分子ロート」を用いることにより、単一の分子を直径 $1-5 \mu\text{m}$ のレーザー光中に流れにより導入しうる。電場の作用により、ブラウン運動が制限され、各分子はレーザー光の最高強度の部位に通される。反対側の検出器および液浸光学系を伴う光学ユニットの配置が良好な光子流並びに全ての空間方向に発せられる発光の検出精度および効率を保証する(第6図)。例えば、この配置はエクソヌクレアーゼ的分解による単一のDNAまたはRNA分子の配列分析(J.H.ジェット(Jett)等、US 4,962,037)ばかりでなく、標識および荷電を提供された単一分子の検出にも有用である。

21. 定常または振動場における電氣的分子とラップを用いた単一分子の検出

また、イオン化した単一分子を電場内の強制並進により観察域に導入しうる。別に、測定容積内で単一または反復並進を強制することもできる。これは第6図に図示した配置で行うことが望ましい。分子流は中央に観察域が存在する大きな試料容積を通過する。定常的または振動的な電場により観察域内を荷電分子を移動させることができる。このようにして分子を表面的に絞ることができる。この「分子フォーカシング」は定量的に検出すべき分子が全測定容積内に1つまたは数分子しか存在しない場合に重要となる。

これを行うために、試料はB.サクマン(Sakmann)およびE.ネハー(Neher)が示したように2つのマイクロキャピラリーの出口の間にマイクロドロップとして固

定するのが望ましい。このキャピラリーはキャピラリーの出口で水性バッファシ

ステムと接触するように導電性の金属層で、望ましくはクロムで下塗りした上に金で蒸気コートすることが望ましい。測定エレメントは試料液滴内にあり、顕微鏡の対物レンズは液滴と直接接しているか、または液滴がシートで対物レンズで離されている。

一度、キャピラリーの末端を離れた後、単一分子または分子複合体が検出されれば、速度論的データが得られる。小さい容積中での場または温度ジャンプを技術的に実現するのは難しいことではない。もし、反応複合体がウェン (Wien) 効果を示すかまたは十分高い反応エンタルピーを有するなら、これらのパラメータは、例えば反応速度定数を測定するための緩和法に使用することができる。

測定容積内での核酸などの荷電分子のキャリアー・フリーな電氣的濃縮を伴う単一分子の検出の原理は、非常に希薄な溶液中の単一分子の分析に非常に重要である。特に以下に示す2つの特徴が重要である：本発明に従う $10\text{--}1000\text{ }\mu\text{l}$ もの大量の試料容積から $10^{-9}\text{ }\mu\text{l}$ の測定領域への1つまたは数分子の能動輸送は 10^{10} から 10^{12} 倍の濃縮を意味する(第20図、第21図)。

1ml 当たり1つの分子とは約 10^{-21}M の濃度に相当する。先に述べた濃度は測定領域中で最終濃度 10^{-9}M となる。DNA分析のセクションで示したように、同時に濃縮される色素標識プローブとのハイブリダイゼーションを速い反応速度で行うことができる。

このことは診断において傑出した進歩を意味する。このように、これまで実現できなかった感度の診断が、特に酵素依存の増幅操作やそれに伴う増幅産物による汚染の危険などの問題を避けて行うことができる。このことは細菌およびウイルス診断において特に重要である。

もし、ウイルスまたは細菌が希薄溶液中に存在し、これも負に荷電している過剰の共存核酸で汚染していないならば、分析は汚染核酸の予備的分離無しに行いうる。このことは、例えば非常に少量の生物物質を遺伝的に分析する法廷化学分析の場合にあたる。臨床分析では精液、尿または血漿などの体液の無細胞上清に関する分析となる。

大量の共存核酸は濃縮過程およびハイブリダイゼーションを妨害する。しかし

核酸は特異的ハイブリダイゼーション法などにより予め濃縮する事ができる。この事を行うためには特定の核酸を大容量の試料から、例えば望ましくはプローブと相同的ではない逆鎖プローブを結合したモル過剰量の固相を添加することにより抽出し共存する汚染核酸から分離する。続いて核酸を溶出し、本発明に従って測定容積内でこれらを濃縮する。

基本的にその他の分子も本発明の電氣的トラップにより測定領域内で濃縮しうる。核酸の場合の様な分子の本質的性質としての荷電、または培地条件による荷電、または特定のリガンドとの反応による荷電のいずれかのターゲット分子の荷電性が必要となる。

本発明の望ましい操作において核酸以外の検出反応における標識リガンドまたは特異的色素標識がプローブを解析でき、テスト分子は特異的複合体形成が既に起こった後にのみ電場による測定領域への輸送が起こる。本発明に従い、この事は荷電していないか、またはターゲット分子およびレセプター・ターゲット複合体および測定領域で濃縮されるリガンドと異なる荷電を有する場合でさえ非複合体化プローブで行うことができる。

第30図は双極子トラップ中の荷電分子の動きを示している。レーザー照射容積エレメント内の水中の負に荷電したローダミン標識したdUTP分子の濃度および振動の変化を電場強度10kV/cm および周波数4Hz の振動電場で示されている。観察の光学軸は電場勾配に対して直角である（第6図参照）。測定領域内の分子を濃縮する効果は明白である。この濃縮効果は電場が解消され、分子が拡散で観察領域から離れるときに解除される。第6図に示したマイクロキャピラリーを逆にすることでも同様の結果が得られる。

第31図は水中の単一のローダミン6G分子の光子シャワーを示している。光子シャワーとは分子がガウス分布測定領域内に存在する間に受ける検出される光子の総量を意味する。従って、単一の発色団を有する単一分子の信頼しうる検出の可能性が証明された。第31a 図： $2.5 \times 10^{-11} \text{M}$ ；第31b 図： $4 \times 10^{-10} \text{M}$ 。チャンネル時間は拡散時間と同じ $4 \times 10^{-5} \text{sec}$ ならびに ガウス分布測定領域 $0.24 \mu\text{m}$ であった。

22.PNA (タンパク質様核酸)

本発明に従う特に適当な分子とは、荷電していないか、またはそのリン酸バックボーンの荷電と反対の荷電を通して複合体の静電的安定化に寄与していることから核酸に結合する挙動が特にしっかりしている分子である。ハイブリダイズしうる分子が必ずしも核酸の化学的特徴を有している必要はない。いわゆるPNA分子が特に本発明に有利に利用しうることが示されてきた。

比較的長鎖の核酸ターゲットの場合、このことは電荷および電気泳動の分離挙動を決定し、例えばプローブ分子の反対電荷を過剰解消してしまう過剰負電荷のターゲット分子によって成し遂げられる。このように複合体化したターゲット分子をハイブリダイゼーションの完結後測定領域内で選択的に濃縮しうるが、過剰の標識プローブ分子は測定領域から除去される。

また、例えば、本発明の方法は酵素的核酸増幅操作無しに、血清約100 μ l-10 ml (10^{-20} ~ 10^{-22} Mに相当する) 中の単一ウイルス粒子の直接検出を可能にする。

実施例として血清試料中の核酸による検出では、以下の必要事項が満足されなければならない：

- 上述した量の血清にはハイブリダイゼーションしうる核酸 (DNA またはRNA) を含む単一のウイルスが含まなければならない。
- その溶液には蛍光標識したテスト試薬として本発明の特異的核酸プローブを含まなくてはならない。プローブの長さは、血清中には高モル過剰量のRNA分子が存在することからターゲット配列に対して高い特異性が保証されるように選択されなければならない。
- プローブの長さを選択する場合、相補的RNA またはDNA に対する結合の安定性を考慮しなければならない。可能なら解離速度は 10^{-5} sec^{-1} 以下であるべきである。このことは遊離のプローブ分子が除去され、即ち推定濃度 10^{-20} Mでの平衡が解離分子側に完全に偏った場合でさえも1日はハイブリッドが安定に保持されることを意味する。本発明に従うと、このことは後に電気泳動で遊離プローブが望ましくは 10^{-20} M に希釈される場合に起こる。
- ハイブリダイズしたとき、プローブは会合およびハイブリダイゼーションが秒

から分の範囲で起こるような高い濃度で存在しなければならない。本発明の場合、以下に議論する物質が会合を促進するためにハイブリダイゼーション媒体が添加されるならば低い濃度でも使用しうる。

－プローブは少なくとも本発明に従う1つ、望ましくはそれ以上の蛍光色素に化学的に結合される。遊離のプローブの電気泳動移動度は複合体を形成したプローブの移動度とは異なる。この事は単にサイズの差または構造の差または本発明に従って修飾した中性または陽性に荷電したプローブ誘導体を使用する事で行いうる。

本発明の分析は望ましい態様で示す特定の電気泳動ユニットと組み合わせた本発明で請求している装置で行われる。

それにはキャピラリーの出口（直径約 10^{-3} mm）を有する電気泳動セルが含まれ、本発明に従う単分子蛍光装置（FCS）と組み合わせられる。

第12図は電気泳動セルの望ましい態様を模式図で示してある。それには (1) 分析する試料および／または洗浄溶液の添加／収集を目的とした少なくとも1つの出口；(2) 壁電極；(3) リング電極；(4) ネハー・キャピラリー；(5) 電極としての金メッキチップ；(6) 液滴出口；(7) レーザー光線が含まれる。

電気泳動セルはプライマー溶液が出来るかぎり正確な量で添加される測定試料で満たされている。壁電極とリング電極の間の電圧は例えば分の範囲内でリング電極中のプローブおよびハイブリッドの濃縮が起こる時間に渡って供給される。その後、壁電極とキャピラリー・チップの間に高電圧がかけられることが望ましい。この時点から遊離プローブおよびハイブリッドの分離は電気泳動で出来るかぎり適正に行えるようにキャピラリーの長さが選ばれる。遊離プローブはハイブリッドが測定にかかる時間とは明らかに異なる時間に電極の出口に出現するので、この時点で未結合のプライマーの濃度は十分に希釈されている。この溶液は液滴として出てくることが望ましく、その結果逆拡散が起こりえなくなる。もし可能なら2つの時間： T_1 、遊離プローブが出現してからの時間、および T_2 、ハイブリッドが出現してからの時間は固定しておく。ハイブリッドは所定の時間にマイクロドロップとして出現し単一の分子蛍光として検出しうる。また、キャピラリーから出口までの光学的測定もできる。

もし、遊離プローブからのシグナルが大きく揺らいでいるなら、単一分子の測定は困難である。1 ml 当たり 1 個の分子は 10^{-20} から 10^{-22} M に相当する。しかし反応時間のために、会合のためのプローブ濃度は約 10^{-10} M でなければならない。この場合、本発明の電気泳動との組み合わせが未分離の混合物の種々の測定よりもシャープな分離を可能にする。さらに、生成されるハイブリッドは正確に計算できる時間に、 $\leq 10^{-12}$ l の容積内に出現し、これは本発明の方法で検出可能である。適当な蛍光標識を選択する事で蛍光を至適化する事ができる。

23. 分子トラップとの組み合わせが有る場合、又は無い場合に単一分子ソーティング法に関して目的の標識複合体を大量に選択するための装置。

分子、分子複合体、ウイルスまたは細胞が目的分子として FCS で認識される場合、直接的に大量濃縮できる可能性がある。これは、電気泳動により各分子が測定直後の限定された時間、限定された場所に存在し、そこで電気泳動的に分離しうる事が前提となる。

電場での移動度の測定、キャピラリー電気泳動での実時間測定、相関の実時間測定、シーケンシング

例えば、キャピラリー電気泳動法を用いた電場での分子、または分子複合体の移動度の測定により、その分子の性質に関する情報が得られる。従って、例えば蛍光標識を用いたエドマン分解産物としてのタンパク質またはペプチドのアミノ酸はこの電気泳動の移動度により測定しうる。近年、ペプチドおよびタンパク質の配列分析は非常に重要になってきた。現在市販されている気相分析器における分析量のタンパク質の使用は重要な進歩である。このようにして、二次元ゲル（オフアール・ゲル）の単一スポット由来のタンパク質はシーケンシングしうる。

この方法の効率は引き続き行われるキャピラリー電気泳動の評価における分解産物の分析的測定の感度が増加できれば、さらに向上することができる。従来の検出法と比較して、実時間測定（実時間相関）と組み合わせた FCS によるピーク測定で驚くべき感度の高さが達成できる。このように、キャピラリー電気泳動で得られる分析量のペプチドおよびタンパク質で配列決定するのに十分である。当

初の量として、単一細胞はそこに含まれているタンパク質の配列を分析する(K)に十分な量である。一方、この方法の感度は測定すべき2Dゲル電気泳動で分離したタンパク質、ペプチドまたは分解産物の実質的に長い配列の構造に対しても有効である。

PCRなどの酵素依存の増幅反応ではかなりの付加的ステップ無しにはこのような感度は達成しえない。高い増幅を受けた生産物による汚染に関する酵素依存の増幅に関する問題は本発明の方法では発生しない。

電気泳動法と組み合わせた本発明の方法は、核酸への応用に限定されない。タンパク質およびタンパク質の複合体または低分子化学リガンドも荷電キャリアが提供され、本発明の分析が可能となる。例えば、負または正に荷電したポリペプチドはそれらを非変性の条件で電気泳動にかけるため組み換え法で調製した抗体に結合しうる。例えば、ウイルス当たりに大量に生成されるか、血清中に単独で分泌される表面タンパク質の抗原分析が可能な場合、低いウイルス濃度でも検出が可能である。

単一分子を検出するための電氣的トラップの変化には双極子の代わりに四極子を組み込むことがあげられる。四極子面の振動場を適用することにより、適当な電場強度での荷電分子の四極子領域からの熱的拡散を防ぐことができる。もし、本発明に従って更に2つの電極を四極子の上下に配置すれば(六極子)、適当な電圧を外の六極子電極と四極子の平均電圧の間にかけた後に荷電分子は四極子の振動場に動き、そこで濃縮される。

六極子電極は2つの顕微鏡対物レンズの金属被服ガラス表面で形成しうる。もし、単一分子が約 $40\mu\text{l}$ の六極子容積内に存在するなら、これは $4\times 10^{-20}\text{M}$ の濃度に相当する。六極子電極と四極子面の間(距離約 1mm)に 100V の電圧をかけると、核酸分子は約1秒以内に四極子面に移動する。四極子面に捕まった分子は約 6fL の容積内に存在し、これは約 $2.5\times 10^{-10}\text{M}$ の濃度に相当し、濃度は 6.4×10^9 濃縮したことになる。その存在は分子数($N=1$)およびこの分子に特徴的に拡散時間を測定することにより証明される。

四極子および/または六極子に実際にかけられる電圧および電位差は分析溶液のイオン強度に依存する。

種々の要素が四極子面の異なる空間位置を示す、位置感受性検出器を使用する場合（なだれ型フォトダイオード検出器）、検出器と四極子の電極間のフィードバック配置により、電場勾配は分子が常に四極子内の固定した位置に留まるように調整される。この位置は各検出器によって規定される。

24. 電氣的トラップ

簡便のため、上述の「電氣的トラップ」は測定部分を通る共通軸上に有る2つの正（負）に荷電した極（電極）の間の中央に測定部分を配置することにより実現される。この軸と直角の面に、少なくとも2つ、望ましくは4つの電極があり、その間に振動電場が生成される。電極はそれらが、もしくはそのペアが互いに向き合うように配置される。これらの電極に回転振動電場をかけ、その中に正（負）に荷電した分子を置く。振動電場に垂直な2つの電極の荷電のために分子はこの振動電場からの動きを制限される。先に紹介し、後により詳しく説明する二重顕微鏡を使用する場合、電極は2つの相対する対物レンズのサポートとなることが望ましく、その共通の焦点中に測定部分が設定される。

ルーチン分析に「電氣的トラップ」を使用する時、ターゲット分子複合体は観察するために比較的大容積の試料から（ $10\text{--}100\mu\text{ l}$ ）非常に小容積の測定領域にもってくることが重要である。これを行うために、簡便性のため本発明では荷電ターゲット分子は大きなポテンシャル勾配を越えてゼロポテンシャルの容積エレメントに運ばれ、その内外では例えば固定および／または測定領域の運動制御のため、例えば四極子等の多極電場で制御される。このことは試料を受け取る数ミリメートルまたは数センチメートルの長さのキャピラリーで行われることが望ましく（第20図、第21図）、その一端には例えば+100（または-100）Vの電圧がかけられ、もう一端は0Vにアースされている。アースされている電極はピンホールを有し、その後ろには例えば低電圧の四極子振動電場がかけられている（第20図参照）。電気泳動移動度 $\mu = \text{ca. } 10^{-4}$ から $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ に従い、ターゲット分子はピンホールに迅速に移動し、幾何学的に隣接する四極子電場へと動きつづける。もしキャピラリー電気泳動で見られるような電氣的移動に関して電気浸透効果が重なることが望まれるなら、キャピラリーは例えばガラスまたは石英で作成する。

別に非荷電の表面を有するテフロンで作られたキャピラリーは電気浸透効果が実質的に排除される場合に使用しうる。

25. 大量の試料集合体における変異体スペルトルの適応度の測定

進化論的スクリーニング検定法において、本発明の方法は選択する分子（タンパク質、ペプチド、核酸、抗体）へのリガンドの結合を測定するのに有用である。本方法で達成される高い測定感度は、特に、特定の生理学的または生物学的に興味のある非常に特異的な相互作用の分析を可能にする。その相互作用はリガンドまたは標識したリガンドの結合または未標識のリガンドと標識したインヒビターとの競争を通して測定される。このように変異体スペルトルの適応度測定は大容量の試料集合体から行うことができる。

適応度パラメータには、テストの特定の媒体条件下での

- アフィニティー・パラメータ
- 速度パラメータ
- 酵素的パラメータ

がある。

26. 遺伝子型／表現型結合のための試料キャリアシステム

本発明の分析および表現型変異体の大容量試料集合体の評価において、対応する遺伝子型、例えばコードしているプラスミドまたはコードしているmRNAは、選抜されて進化過程を続けることが重要である。この問題は決して些細なことではない。この過程はより選択的に選抜が行われることにより、より詳細にいうと、対応する遺伝子型が不要な表現型をコードする配列の混入無しに単離できれば、成功する確率が高くなる。

27. テスト・セル

中程度の試料数 (<10,000) には固定して空間的に分離した容積エレメントが採用され、これを以後テスト・セルと呼ぶ。これらはPCT/EP 89/01320、PCT/EP 89/01387、PCT/DE 91/00082、PCT/DE 91/00081、PCT/DE 91/00083、PCT/DE

91/00704 に示されているシステムと同等のシート・システムの一部とすることができ、各容積エレメントにはシールされたシート・エレメント内に試料が含ま

れている。シールされたエレメントから同定された表現型はコードする遺伝子またはmRNA転写物に従って直接的なメカニカルな方法で単離しうる。

28. マイクロコンパートメンタリゼーション

また、超微量試料容積の光学的測定および評価を含む本発明の方法は、非常に少量の試料を通常では取り扱いえないマイクロコンパートメンタリゼーション（微小区分化）することを可能にする。このことは正と同定される遺伝子型を得るために各コンパートメントを充填および選択的に空にすることに関して達成される。

マイクロコンパートメントは特許出願DE 42 37 383.1に示されている平行に配置されたキャピラリー・エレメントのような規則的および非規則的多孔性キャリアー、またはコントロールド・ポア・ガラスなどの多孔性物質または容積エレメントがキャピラリー内で一次元的に分離しているが、そのペアは直接接触しているキャピラリーからなる板状キャリアーから構築しうる。

特に望ましい形のマイクロコンパートメンタリゼーションを第4図に示した。光学的に透明な平板キャリアーの下、各々の表現型および遺伝子型を含む組み換えまたは天然の細胞または人工ベシクルの形で分析される試料中に存在する容積エレメントが使用される。別の態様では、容積エレメントはキャリアーに適用している間またはそれ以後に設定される。ゲルまたはベシクル形成ポリマー、特にカプロラクタム誘導体ポリマー等の熱可塑性構造に基づくポリマーが望ましい。

この応用は、まず、分離した水性容積エレメントを生成するポリマーの分離またはピエゾ制御のマイクロディスペンサーを用いた微分散液滴の適用による均一溶液から行なわれる。

これまで述べてきたように、細胞の内容物も分析することができる。例えば、細胞を先に説明したベシクル構造で包み、後に高温で分解することができる。この場合、ベシクル中に含まれ、分解した細胞の内容物を伴う反応分子又は分子複合体を含む溶液の、少なくとも部分的混合が起こる。反応分子は本発明のFCS法で検出および定量しうる細胞成分との特異的相互作用または反応を行う、例えば

核酸プローブ、酵素またはタンパク質である。この技術はインサイチュウ・ハイブリダイゼーションまたは細胞特異的タンパク質染色と同様の技術である。

また、K.ヘンコ(Henco)等、DE 42 37 381.6の出願に示されているような核酸および分析する表現型分子構造の同時固定のためのキャリアーも遺伝子型／表現型の結合を行うための反応キャリアーとして有用である。

もちろん、遺伝子型をキャリアーのX/Y位置に限定する、いわゆるAFFYMAX技術の範囲にあるS.フォダー(Foder)等に採用されたキャリアーも使用しうる。

29. 選択された表現型フォトマーキング

各容積エレメント内で本発明にしたがって選択された変異体の指定およびマーキングは示された分析光学系を用いることによる位置の光学的マーキングが望ましい(第7図)。このことはキャリアー表面の光活性化可能なコーティングが励起され、例えば選択的脱色により簡単に認識される反応産物を生成しうる波長の光を反射することで行いうる。もし、相関分析が分析される各容積エレメントの所定の値を示すならば光信号が活性化される。

ここでは従来の光反応性コーティングを使用しうる。これもレーザー光源が望ましいが別の光源が使用されるか、また分析に使用しているレーザーを使用することもできる。測定と光活性化による位置のマーキングの分離は、例えばマーキング反応には二倍周波数を使用することで行いうる。また、望ましいエレメントのX/Y位置は電子データ蓄積により収集しうる。

キャリアー上の位置のマーキング後、望ましい核酸が対応する容積エレメントから、例えば機械的方法で得られる。

30. 選択された表現型および遺伝子型の光活性化

選択された容積エレメントをマーキングする代わりに、第7図に従う対応する遺伝子型をマーキングする事が本発明では特に有用である。

本発明に従う以下に示す幾つかの代替法が望ましい：

- (1) 容積エレメントの表面構造体への核酸の光活性化結合、
- (2) 核酸特異的リガンドの光化学的活性化、
- (3) 選択されたもの以外の全ての容積エレメントの光化学的不活性化。

代替法 (1) では、二本鎖インターカレート試薬として360 nmの光照射で核酸両鎖を互いに化学的に結合させるソラレン (psoralen) 誘導体を使用しうる。このようなリガンドは例えばキャリアー表面に化学的に結合することができる (第8図)。

このように十分な数の表現型コードプラスミドをスクリーニングの間にポジティブに選択された表面セグメントに結合しうる。続いて、固定されなかった核酸を全て洗い流す。選択された核酸は直接表面上での酵素依存増幅反応に供される。

別に、その核酸はソラレン結合の可逆性を利用して回収しうる。このことは、例えば260 nmの光で行いうる。代替法 (2) では、核酸結合リガンドは、次に生成が可能で、かつ、望ましくない核酸を分離しうる別の分子に結合しうる。この事は、DNA またはRNA 認識リガンド、特にビオチン、アビジン、スカレプトアビジン、免疫グロブリン、オリゴペプチドまたはオリゴヌクレオチド等のアフィニティー・リガンドに結合した光活性化可能なソラレン誘導体またはインターカレート色素を結合することにより例示される。

第8図に見られるように、これらの化合物をポジティブに選択された容積エレメント由来のDNA またはRNA と光誘導的に化学結合した後、全ての容積エレメント由来のDNA および/またはRNA を一緒に精製し、また、選択基準を満足しなかった核酸からそれらを同時に分離することが可能となる。分子は疎水クロマトグラフィー、アフィニティー・クロマトグラフィーまたは表面がアダプター分子のリガンドに結合する適当な性質を有する磁性粒子で行うことが望ましい。このような特異的結合の望ましい例には、オリゴ-dT/オリゴ-da、アビジン-ストレプトアビジン/ビオチン、NTA-IDA/(His)₆。および同様の既知複合体形成試薬がある。

次のステップでは、このようにプールされた精製核酸を直接酵素依存増幅反応またはcDNA合成に使用することができ、または先ず光化学的に誘導した結合の逆反応でリガンドから脱離することもできる。

本発明では、分析の選択基準に満たない核酸を選択的に不活性化することも考

えうる（代替法（3））。このことはソラレン等のクロスリンク物質を用い、クロスリンクした構造ではもはや連続的酵素反応で増幅されないようになることで行いうる。しかし、この方法の欠点はポジティブに選択された容積ユニットに対する濃縮因子が逆に影響を受けることから、不活性化は完全に行われなければならないということである。代替法（1、2）において、濃縮の収率はたいして重要ではない。酵素依存増幅法により、非常に少数のコピーも本発明をカバーする程度に濃縮することができる。しかし、ほとんどの応用に対しては、ポジティブに選択された容積エレメント由来の核酸の割合が出来るかぎり大きいほうが有利である。このことは、例えば分析で考えられている容積エレメントよりも大きい容積エレメントを光学系が照射することで達成される。

31. フラクシオン分析／フロー・インジェクション分析／GC/MS カップリング

分析／調製分離法とカップリングしたフロー・インジェクション分析は、活性物質を発見し、または化学的または酵素的に生ずる擬種を至適化する（DE 43 22 147およびWO 92/18645）緩慢な化学的または生化学的反応の方法に本発明の方法をカップリングする上で特に重要である。

先に示したように、本方法は数に関して複雑であり、また進化過程で予備的に発生する分子集合体の解析および評価に特に有用である。しかし、この事は別にしても分子多様性を有する複雑なシステムの機能的解析はかなり重要である。多様性は複製メカニズムを通して進化システムだけで発生するのではないのと同様に、サブポピュレーションのコンパートメンタリゼーションは細胞またはベシクル構造でのみ生ずるのではない。

合成化学において種々の分子型の非常に複雑なシステムが故意に、または無作為に生成しており、所定の種類の複雑性を選択的に生成しうる。微生物または植物は種々の二次代謝物を合成し、そこから多量の医学的活性物質が誘導された。周知のようにHPLC、FPLC、ガス・クロマトグラフィー等のクロマトグラフィー法を使用して、このような化合物を効率的に分離および単離することができる。

本発明の方法は核酸またはタンパク質等いわゆる複製系由来の変異体の平行分析を行うばかりではなく、化学的または代謝的に複雑な混合物由来の変異体も分

析する。従来、この操作は、先ず複雑な混合物を個々のフラクションに精製し、これらを化学的に分析、および／またはその構造を解析し、可能ならば純粋な形で個々に生物学的検定することであった。

現在、本発明の方法を用いることにより、例えば薬学的検定を行うために当初分析的に少量しか存在しなかったフラクションまたは個々の物質を分取して使用することが可能である。本発明の方法の望ましい態様では、得られたフラクションを直接FCS 検定に連結することができる。FCS 検定において各問題にポジティブに応答する以前に、個々の物質を生産することは省略される。現在行われている活性物質に対するブラインド・スクリーニングは活性物質を含むフラクションを選択的に調査することで置き換えることができる。

材料の複雑な混合物中の機能性化合物の分析は薬学において厄介な作業である。第1に、すでに述べてきた微生物および植物由来の天然物の複雑な混合物が知られている。日本の研究所および企業は、最初の抗生物質を導入したことから各々の新しい検定法においてスクリーニングに導入しうる新しい構造の精製物質の拡張バンクを持続的に確立していくことによって追いつくことが困難である他の国に対して、天然物質をスクリーニングする上でリードしている。この事は、これまで知られている活性構造の二重開発を意味する反復検出が回避されることから、生物を培養するよりも単純である。

その利点のため、本発明の方法は本操作を断念することができるが、個々の分子が実質的に純粋物質として回収されることから非常に拡張されか、複雑な混合物の分析も可能である。単一の微生物は千個以上の複雑な構造の二次代謝物を合成しうるが、そのいくつかは少量として存在するのみで抽出物の全混合物の分析においてその機能で同定する事は出来ないことを知っておかなければならない。本発明では微生物由来の物質の混合物または幾つかの微生物または植物抽出物の混合物を先ず、例えばクロマトグラフィーで分離し個々のフラクションについて分離マトリクスの終わりにあるキャピラリー中、望ましくは「オン・ライン」で機能化合物の存在を検定する（第9 図参照）。

以後第9 図を説明する。本発明によりクロマトグラフィーによる分離を組み合わせる複雑な物質混合物を分析しうる。クロマトグラフィーによる分離後、標識

した参照分子を連続的に、かつ一定濃度でフラクションに添加し、さらに、これに特異的結合ターゲット分子を一定濃度で添加する。第1図に示したように、各濃度で約分子の50%が複合体を形成し、その結果分離された混合物由来の妨害物質を最高感度で検出するように各濃度を選択する。

その後、合わせた試料はキャピラリー・フロー管を通して検出ユニットに入る。このフラクションは、目的の結合平衡を特異的にシフトするかどうかを分析される。

例えば、複雑なシンソン(synthon)混合物を使用したとき、アルキル反応における多様な置換または非置換アルキル残基の混合物も上述のように分析的にカバーしうる。従って、各反応ステップ後、反応混合物から形成される化合物を分離してその特性を調べる必要はもはや無い。

望ましい態様(第9図)では、混合物をレセプターを含む溶液に添加する前に、先ず各フラクションに妨害を分析する物質の部分標本を添加し、競争反応を測定することができる。別に、若しレセプターが既に占有されているならば、遅い解離速度定数は置換反応の検出を複雑にする。遅いレセプター置換反応は、時間変化、即ち k_{off} の測定を可能にする。

32. ターゲット分子との物理的相互作用に関するパラメータの大まかな評価を伴う生物機能的相互作用に関する複合体混合物のスクリーニング

もし、本発明に従い例えばLC/FCSカップリングにより、ターゲット分子との相互作用に関して種々の物質混合物を分析するなら、対応する各ガイド構造の質的評価を可能にする結合定数の上限または下限を直接評価することができる。このことは以下の実施例で説明する。

各探索される物質が0.1%量しか含まれない1000個の物質を含む $10\mu\text{g}$ の物質混合物をLC分離装置にかける。このことは絶対量が1ngであることに対応する。フラクションの分離後、この量の物質が $5\mu\text{l}$ の容積に存在する。分子量を200ダルトンと仮定すると、これは 10^{-6}M の濃度に対応する。ターゲット分子、例えばレセプターを同程度の濃度で添加すると、複合体の形成は、反応速度が所定の最高値を越え、かつ、結合定数が $>10^6$ あるならば、所定の時間内に完了するこ

とができる。

この検出反応は活性であると同定される化合物の構造データを直接得るために、HPLC/MS またはGC/MS とカップリングする事ができる。

また、本発明の分析法の物質の微量化はオンライン分析に使用する場合のシグナルのドリフトの問題をこおむるバイオセンサー技術を用いた種々の代替法に対抗して本発明の分析法を使用を可能にしている。上述のクロマトグラフィーのかわりに試料ディスペンサーを使用できる。

DNA/RNA プローブ検定法

本発明の技術の強力な検出感度をフルに利用したとき、DNA またはRNA プローブ技術に特異的な問題が生ずる。分子レベルでの本発明の検出反応は少なくとも互いに相補的な一本鎖構造からなる二本鎖構造の形成を必要とし、該一本鎖は化学的な修飾を含みうるDNA またはRNA 基本構造物、またはDNA およびRNA の混合物を含み、かつ、該修飾は特に基本構造、特に塩基の化学発光性を修正する構造または特異的分子または分子複合体への特異的結合性を有する、および/または化学発光置換基である置換基を保持する構造に適するものである。

しかし、二本鎖構造の形成は比較的ゆっくりとした反応である（ハイブリダイゼーション、 cot 速度論）。実験的には、このことは細胞由来のゲノムDNA の再生が実験条件に依存して週または月の単位で継続する過程であり、その結果、この実験は事実上完全には行うことができない。例えば真核生物ゲノムあたり>100,000個の割合で生成する反復ゲノムセグメントだけは再ハイブリダイゼーションしうる（デビッドソン (Davidson) およびウェットマー (Wetmur)）。

実際によく使用されている近似式で変性二本鎖の再生が表されている。

$$t_{1/2} = N \times \ln 2 / (3.5 \times 10^5 \times L \times C_0)$$

$t_{1/2}$ は $T = T_m - 20$ 、イオン強度 1 M における秒の単位で示された再生の時間を示している。L はプローブ断片の長さ、N はユニット配列の長さ、 C_0 はヌクレオチドの濃度および 3.5×10^5 は再生の本質的速度定数の近似値である。

反応速度が2つの反応物（+ および- 鎖）の濃度の総計に依存するので、一般に再生速度を促進するには2つの可能性がある。従来のプロット検定法では過剰

量の成分が速度を決定するので、通常プローブは過剰量で使用され、後に洗浄ステップで過剰のプローブが分離される。PCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）などの酵素依存増幅反応の導入で、その反応速度を測定する程度までに検出すべきターゲット核酸を増幅することができる。しかし、もし増幅反応が本発明の方法で免ぜられるならば、またはその検出がワンポット操作におけるプローブ成分の厄介な分離無しに行われるならば、本発明に1つ以上のプロセスおよび操作が組み合わされる。

本発明の検出に十分であるガス相（空気細菌）または溶液または懸濁液の小容積試料中のウイルスまたは細菌病原体の検出感度は、簡単な濾過ステップを用いることで増加することができる。これらは大量の容積からフィルターまたはフィルターシステムを用いて抽出し、小容積に含めることができる。別法には例えば被覆磁性粒子による濃縮がある。

DNA/RNA 分析ではインターカレーティング置換基を有するプローブを使用することができる。インターカレーションで蛍光挙動が変化するか、または増加するこれらの発色リガンドの使用は特に望ましい。チアゾール・オレンジ類の置換基は特に有用である。インターカレーション状態ではこれらの蛍光収率は遊離状態に比べて約1000倍大きい。従って、1000倍過剰量の非色素インターカレーティングプローブ存在下でのインターカレーションにより特異的複合体の形成を測定することができる。

プローブに結合したオリゴマーまたはマルチマー色素を使用することにより、より少ない個々の事象が必要とされるシグナルを生成して検出されなければならないことから感度はさらに10-100倍増加しうる。

過剰濃度の二本鎖分析物は反応を促進するのに必ずしも望ましくない。もしも過剰に存在する分析物のカウンター鎖が複合体とさらにハイブリダイゼーションするならば、複合体由来の既に会合したプローブの不都合な置換が起こる。

本発明ではこの問題は例えばPCR 反応における非対称な開始により、または細胞内で天然に生成するRNA ポリメラーゼによる、または3SR などの相対的増幅反応で生成することによる特異的RNA 配列の決勝戦(run-off)生成によるようなカウンター鎖無しに特定の極性のみで存在する過剰量の分析物に注意することで解

決している。

また、置換反応は複合体を熱力学的に安定化するインターカレーティング置換基（例えばアクリジン色素）により、または不可逆的クロスリンクを開始することにより（ソラレン誘導体）で防ぐことができる（特許出願P 42 34 086.1 参照）。

本発明の上述のパラメータの至適化を通して 10^{-12} Mの範囲の標識プローブの使用が可能であり、かつ 10^{-14} M範囲の分析物（カウンター鎖）が検出できるならば、再生の反応速度（複合体形成）は受け入れがたいほど遅くなる。上述の近似式を用いて200ヌクレオチドの長さのフラグメントは、本発明の方法による光学的測定前に寿命の10倍待たなくてはならないなら、会合するのに約23,000分（16日）かかるであろう。

フェノールに基づく有機性溶剤およびチオシアネートまたはパークロレート類のようなカオトロピック塩の組み合わせを用いることにより、反応速度を約100,000倍も促進することができる（キュンケル(Kunkel)等）。実際にはこの方法はフィルター検定法ではうまく行かなかった。しかし、この方法は溶液でうまく行うことができる本発明の方法と組み合わせることができる。このように、上述の例の反応速度が秒の範囲でシフトするばかりでなく、同時にその溶液がRNA分析物に対する例えばリボヌクレアーゼの作用による分解プロセスを防ぐ。

また、この方法は種々の輸送ベシクル、LDL、VLDL、およびHDL間の鎖を探すならば脂質代謝における種々の診断に必要とされる大きなベシクル複合体の検出を可能とする。従って、今日まで比較的複雑な電気泳動法を困難な定量に使用しなければならなかった。本発明に従って、色素標識ベシクルは移動度および／または回転拡散測定により区別しうる。このベシクルを蛍光標識した特異的抗体で染色しうる。別に蛍光ラベル分子は特異的に、かつ永久にベシクル構造中に取り込まれうる。

インビトロ・トランスレーション生産物の機能検定法

本発明のスクリーニング技術の使用は、インビトロタンパク質生合成と組み合わせたタンパク質またはペプチドの形をした複製分子の分析に特に重要である。インビトロタンパク質生合成は組み換え細胞システムを回避している。しかし、

インビトロタンパク質合成の効率が小さすぎて合成産物の機能の検出を出費をかけることなく行うことは不可能である。平均して1つのmRNA分子から1つ以上のペプチドまたタンパク質分子が生産される。この結果はより悪くなりうる。しかし、本発明の方法の感度はmRNAが μ Mの濃度範囲でのみ合成混合物中で使用しなければならず、また分析には小容量の試料で十分なことから機能の測定が可能となる。

分子サイズの分布の測定

高分子化学の分析において、ポリマーの分布を測定することは重要である。この事は超遠心法および物理的フロー法の代替法となる本発明の方法を用いて容易に行いうる。オリゴマーに本質的な蛍光を用いることもできるし、また発光性リガンドとの会合または結合を観測することもできる。

イン・サイチュウ・ハイブリダイゼーションとは標識した核酸プローブと相補的ターゲット核酸との特異的二本鎖形成を分析する目的物の幾何学的配置を固定して行う方法である。分析される目的物は分子または分子複合体の表面固定調製物である。例には染色体、転写複合体または翻訳複合体の調製物が含まれる。ルーチン分析では、表面固定した組織スライスまたは細胞培養物由来の細胞が重要となる。

ダイナミック・レーザー相関分光光度法

その感度のために本発明の方法は、核酸以外のリガンドの場合、ハイブリダイズした、または複合体を形成した蛍光標識結合リガンドの位置を決定することができる。本発明の利点は単一分子の検出感度が高いことに基づいている。このことは酵素依存増幅反応が必要な場合、または多糸染色体の場合のようなターゲット分子が局所的に高濃度になることを必要とされる場合の直接分析を可能にする。目的構造の相対的位置を決定しうる本発明の方法における二重または多重標識の使用も請求の範囲に含まれる。

ダイナミック・プロセスの分析に関してピンホールを使用することによる最小容積エレメントの共焦点イメージングを含む本発明の方法は、本発明に従い構造

の空間高分解能を得るためにレーザー・スキャンニング顕微鏡で使用される従来

法と組み合わせて使用しうる。レーザー・スキャンニング顕微鏡を用いる場合は蛍光強度のみが測定量として使用されるが、本発明の「レーザー相関顕微鏡」は二次または三次元的に結像される空間座標(x,y,z)で規定される測定エレメントにおける相関関数およびその動的内容を使用している(第10図)。このように、例えば細胞または他の生物学的対象物における標識分子の二次元的(断面)または三次元的な動的像を描くことができる。

以下に第10図を説明する。本発明の光学系の原理機構が示されている。試料は試料ホルダーに納められ、それは二次または三次元的にコントロール可能なピエゾ素子で所定のスクリーン内に移すことができる。各関連容積エレメントを動的プロセスに関して分析し、全体としてコンピュータにより二次(断面)または三次元像に組み立てられる。

33. 流行病的に保存されている遺伝子セグメントの測定

ハイブリッド二本鎖の解離定数の測定を通して、上述の解離定数の測定と同様にホモロジー評価を行うことができる。このことはHIウイルスのような発散病原体の流行病学的解析に非常に重要である。診断プローブを開発し、その信頼性を評価するために、種々の生物由来のいくつかの遺伝子セグメントをそれらのパラメータについて検定しなければならない(第22図)。

ターゲットゲノムに関する多数の突然変異の同時検定法

遺伝病の分析において、多数の変異体の存在を同時に検定するという問題がしばしば発生する。このことは特に優性遺伝子病またはX染色体コード型の病気の場合である。劣性病の場合、1つの対立遺伝子上に特定の点突然変異が発生したか、または両方に発生したかを評価することは重要である(今日までに30以上の変異体が見出されてきた嚢胞性繊維症参照)。本発明の操作は1つの試料中の種々の突然変異を同時に分析することを可能にする(第23図)。

表現発現細菌の結合特異性による単一細菌の検出

最近のバイオテクノロジー的研究の重要な多くの応用に関して、もし所定の試料中の機能性生体分子の検出の代わりに、単一の細菌またはウイルスの検出法ができたならば非常に便利で効率的である。非常に興味深い重要な利点は、表現型

発現産物、例えば天然または組み換え表面タンパク質のその遺伝子テンプレートへの結合である。

微生物のゲノムには約 10^7 個のヌクレオチドが含まれる。ショットガン発現により平均長100 アミノ酸残基のフラグメントが従来法により発現できる。読み枠の変化（因子3）および仮定される非コード相補鎖を考慮すると、 10^8 個の組み換え細菌クローンは約100 倍の各セグメントを含んでいる。100 の1 mlの懸濁液に含まれる 10^8 個の組み換え細菌クローンを、例えばアレルギー患者由来のIgE に対する結合性に関し、本発明の方法を用いて約24時間で個々に試験することが可能である。対応する特徴の細菌を単離するか、または少なくとも非常に濃縮し、かつ生物的に増殖しなければならないか、または対応するゲノムセグメントを酵素依存増幅法で増幅し、かつ特徴付けなければならない。

このような問題は例えば、WO92/18645に示されている突然変異誘発法および淘汰法を用いることによるペプチドおよび／またはタンパク質の進化的至適化の方法に関連している。24時間以内に約 10^8 個の細菌を、所定の濃度のターゲット分子と相互作用する能力を有する表面タンパク質／ペプチドを発現する細菌の存在に関して特異的色素標識した物質への結合性によりスクリーニングすることができる。対応する細菌は従来法で反応混合物からクローニングしうる。

別の重要な応用は、cDNAライブラリーまたはサブジェニックな構造要素のライブラリー（形空間）由来の遺伝子セグメントの機能的マッピングに関するゲノム・プロジェクトに由来する。このように、例えば、ターゲット分子への結合挙動など、広い集合体由来のゲノムおよび／またはサブジェニックなセグメントの機能を測定しうる。

遺伝子的にコードされているペプチドセグメントの機能指定を示す方法論の使用は、アレルギー研究において非常に重要である。アレルギー原に関する免疫優性エピトープの同定は（例えばアスペルギラス、ミルクタンパク質、 α -アミラーゼ）非常に重要であり、今日まで解決しにくかった問題である。実際に発生し

た典型的問題を以下に示す。

通常、病気に関連する物質の混合物中のIgE 結合分子の決定。例えば、大豆の

レシチンのどの部分が免疫原か、純粋な物質だけか、調製物の不純物と相互作用する純粋物質か、または宿主生物の構造物との相互作用か、この問題に答えることは非常に重要である。本発明では混合物中の種々の物質を患者由来の標識化IgEで分類する事ができる。

サブジェニック遺伝子セグメントの発現により、上述の方法により免疫優性エピトープを決定し特徴を明らかにすることができる。これらの結果を用いて、
- 対応する免疫優性領域を欠く進化的に類似する機能分子、例えば少ない免疫原性 α -アミラーゼをW092/18645に示されている方法を用いて生成できる。また、
- 特異的エピトープを遺伝子工学の標準的方法により調製でき、または純粋なテスト試薬としてまたは感度減少に使用しうる。

装置

この測定配置は以下に示す配置のレーザー光の回折制限フォーカシングにより本発明の方法を行うのに特に有効な装置である。第14図に示したように、この装置はプレ・フォーカスしたレーザー光に特徴がある。フォーカシングレンズと一定の結像距離を保つ交換可能な顕微鏡光学系を組み合わせることにより、プレ・フォーカスしたレーザー光の径を変えることができる。二色性ミラーにより反射後、プレ・フォーカスしたレーザー光はカバーガラスがある場合も無い場合も空気または水浸漬光学系により例えばキャリアー上、または吊り下がった1滴中に存在する試料容積に結像される。通常蛍光の発光が励起光の方向に対して180°の角度にある浸漬光学系により集められ、結像される。対物板25には、適当なカット・オフまたは干渉フィルターの通過後、半導体検出器エレメント（なだれ型フォトダイオード）上に適当なスケールの像をつくるピンホールがある。この適当なスケールはフォトダイオードの大きさに試料の像を調節することから決まる。フォトダイオードは100 μm の範囲で比較的小さく作り、それらが共焦点検出器に対しピンホールを置換できるようにすることが望ましい。本発明の装置の特別な態様では、このダイオードも検出器に組み合わされて配置することもできる。

ピンホール開口⁵⁰の結像は種々の発光波長に対して至適化した、例えば2つの

検出エレメント53、54上のビーム・スプリッター60を用いて行いうる。ピンホール開口の代わりに、例えば1つ以上の半導体検出エレメント（アレイ）を結像板に置くことができる。

望ましい態様では、レーザー光の回折制限フォーカシング生成用のユニットおよび観察ユニットに相互に分割しうる本発明の装置は、以下のような構築エレメントを有している。レーザー光21をプレ・フォーカスするための器具20にはレーザー光21を屈折させるためのレーザー光路中の二色性ミラー30が含まれる。回折制限フォーカシングで生成されたレーザー光は、例えばキャリアー上に位置するか、または吊り下がった液滴1に存在する試料に二色性ミラー30で屈折された後別のレンズ40により結像される。

場合によっては、観測ユニットはフィルター器具51、光子計数器具52、相関器具71および／またはマルチチャンネル・スケーラー器具72を有している。測定シグナルは場合によってはコンピュータで処理され、および／または評価される。

第15図はレーザー光21をプレ・フォーカスするためのプレ・フォーカシング器具20を図で示している。顕微鏡光学系に相当するレンズL22 およびアレイ23により、レーザー光21はレンズ22を通して結像板 B_1 上に結像される。アレイ23は最初の像として結像板 B_2 にレーザー光を結像する。アレイ23は例えば顕微鏡のノーズ・ピースの形をしたレンズの交換可能な配置を提供されることが望ましい。プレ・フォーカシングしたレーザー光21の径はそれで変えることができる。

本発明の装置の望ましい態様では、検出ユニットは2つの検出器52および54を含み、試料から検出器53および54へ発せられる光55を分割するビーム・スプリッター60を有している。この配置は第16図に示した。試料1 から発した光55が検出器53または54に入る前に結像レンズ56、57およびフィルター・エレメント58、59を通ることには利点がある。特に、各検出器53および54が異なる波長の光を検出できることは有利である。この事は適当なフィルターを選択することで達成される。

もし、検出器エレメントが検出器アレイ状に結像板に設置されるならばピンホール開口50の使用は不要である。検出器エレメントは $<100\mu\text{m}$ の大きさを持つこ

とが望ましい。本発明の装置の別の態様はビーム経路にピンホール50を配置している。

第25図では、測定領域（62に示した）を調べるのに使用する二重顕微鏡の側面が図示してある。この顕微鏡は単独プレートを有する垂直サポート63（長方形チューブ）を有している。サポート63の上側には、中央支持アーム65が水平軸の回りに回転するように取り付けられている。中央支持アーム65は凹むように工夫され、ビーム・スプリッター66および45° 反射鏡67のような光学エレメントと共に内側に提供されている。支持アーム65のベアリング軸68も凹むように工夫され、2つの重なるレーザー光は理想的な回転軸に沿って支持アームに照射され、光路中のビーム・スプリッター66およびミラー67（広いルーフ・プリズム）に衝突する。ビーム・スプリッター66およびミラー67を通して、2つの重なるレーザー光が2つの反対側にある支持アーム65からガイドされてくる。すなわち、この部分で支持アームは開口69が提供されている（ガラスカバープレート）。

支持アーム65を離れた2つのレーザー光70、71はこれらの光を偏向させるビーム・スプリッター72、73にぶつかり、その結果、光の方向は支持アーム65の軸方向と平行になる。

支持アーム65のフリーの端には支持アーム74が結合しており、両方のアームでT型構造を採るように配置している。サポート63から逸れた支持アーム74の前面には、対物レンズ78を含む対物ノーズ・ピース77を伴うボディー・パーツ76の縦の動きをガイドするガイド器具75がある。2つのノーズ・ピース77の相対的配置は、対物レンズ78が互いに向かい合い、共通の光学軸上にある一方、2つの対物レンズ78管に支持アーム74によって支えられている標本台がある。支持アーム74の内側には、反対のネジ山を持つ2つのスピンドル81を有する二重スピンドル・ドライブ80がある。このスピンドル81は支持アーム74に投影されるアーム82とスレッド結合状態にあり、かつ、ボディー・パーツ76に連結している。従って、二重スピンドルドライブ88が運転されるとき、2つのボディー・パーツ76は運転方向に依存して互いの方向に、または互いから遠ざかるように移動し、その結果2つの対物レンズの焦点が結合しうる。

二重ガイド・システムは2つの置換可能なボディー・パーツ76の各々と連結し

ている。これらの二重ガイド・システムの各々は2つのフィッシュ・テール・スライド・レール83、84の形で具現される。これらのスライド・レール83、84は支持アーム74の2つの末端が向き合うように配置されており、ボディー・パーツ76に沿って移動する。2つのスライド・レール83、84は支持アーム74越しに両側（ガラス・スライド側と支持アーム65との連結側）に突き出す一方、支持アーム65に対しては平行である。互いに向き合っている内側には半透鏡またはビーム・スプリッター72、73から来るレーザー光をプレ・フォーカスするための光学エレメント85、86が提供されている。互いに向き合っていない2つのスライド・レール83、84側では測定領域からくる光を処理するための光学系（レンズ、開口、フィルター等）がある。88はピンホールであり、89は蛍光を検出する検出器にピンホール開口を結像するためのバイコンベックス・レンズと呼ばれる。さらに、互いに向き合っていないスライド・レール83、84の外側には、45°の角度に合らし、測定領域62から来る光を光学エレメント87、88に反射する鏡89がある。さらに、相互相関をとるために必要なレーザー光からの情報を電気シグナルに変換する検出器90、91がスライド・レール83、84側に存在する。

第25図に示した二重顕微鏡の作動モードを以下に示す。ベアリング軸68を通して、種々の波長の2つの重なったレーザー光（70、71）が支持アーム65に入り込み、ビーム・スプリッター66に進入した後1つのレーザー光71はビーム・スプリッター・エレメント66によって一方に90°反射され、また、もう一つのレーザー光70はミラー67により反対方向に90°反射される。支持アーム65の隙間69から出たレーザー光70、71はビーム・スプリッターまたは半透鏡72、73にぶつかり、そこから光学エレメント86を通過する。その後、レーザー光は、その端でサポート63および検体ステージ79に面する側に長い穴92が提供されている（第25図ではサポート63に面する長い穴92だけが描かれている）支持アーム74に進入する。さらに、レーザー光はボディー・パーツ76を通り、そこで半透鏡93にぶつかってから、ノーズ・ピース77および対物レンズ78を通過して測定領域62に到達する。測定部分62から反射された光は偏向無しに半透鏡93を通過し、反射鏡89によりスライド・レール83、84の外側の光学エレメント87、88に送られる。その後、検出器90、91に衝突する。

同様に用いられる対物レンズ78に依存して調整可能なように、測定部分へのレンズの焦点62、ボディー・パーツ76およびスライド・レール83、84は先に示したように移動可能である。半透鏡72、73は光学エレメント86のように互いに向き合うスライド・レール83、84側に存在するので、反射鏡67および半透鏡（ビーム・スプリッター）からの半透鏡72、73の距離はボディー・パーツ76およびスライド・レール83、84が移動したときに変化する。レーザー光70、71が支持アーム65に平行に走っている半透鏡72、73の後の領域では、該鏡からの光の距離は変化する。これにより長い穴92内の支持アーム74の相対的位置は変化する。このことから、中央支持アーム65の外側にある全ての光学系は変化するし、2つの移動方向は中央支持アーム65を離れたレーザー光70、71の方向と一致する。

全体の二重顕微鏡は非常にコンパクトな構造をしている。全てのエレメントは重さが「実質的に均一に」分布するように配置されている。検体ステージ79に向かった二重顕微鏡のオペレーターは作業領域の顕微鏡の装備および光学系に邪魔されることはない。二重顕微鏡の中央支持アーム65および全ての光学装置は回転しうる（矢印94参照）。中央支持アームは同軸の2つのベアリングによりサポート63に固定してあり、曲がることはない。2つの対物レンズ78の内の1つは測定部分62が検体ステージ79に位置する部位から2つの対物レンズ78の共通焦点のオフセットのバランスをとるためにピエゾ素子または別の調整エレメント（示さず）で正確に位置決めされる。

レンズ、フィルター、反射鏡、半透鏡等、ここで示された光学エレメントに加えて、行われる測定に必要とされるならば別の光学エレメントもレーザー光70、71の光路に置くことができる。

第17図はローダミンで標識したデオキシリボ核酸を示している。縦軸は規格化した強度相関関数を示している。横軸は対数時間軸である。濃度は容積エレメント当たり (2×10^{-16} l) の標識分子で与えられる。第17a 図は拡散時間0.067msの容積ユニット当たり2分子のモノヌクレオチド・ウラシルを示している。第17b 図は拡散時間1.8msを有する容積ユニット当たり0.3分子に相当する500塩基対のDNAを示している。

第18図はヒトのリンパ球における細胞結合レセプター (β -アドレナリン・レ

セプター)と蛍光標識レセプターリガンドとの相互作用を示している。このシステムの座標軸は第17図と同様である。第18a 図は拡散時間1.1ms の容積ユニット当たり10.7分子に相当するBSS 中の標識リガンドを示している。

第18b 図は拡散時間13s の容積ユニット当たり72分子に相当するBSS 中のリガンドで標識したリンパ球レセプターを示している。

第18c 図は遊離のリガンド76% およびリンパ球レセプターに結合したリガンド24% の状態を示している。

10-100ms以内の蛍光相関関数を得ることができるので、10乃至100s以内に1000ピクチャー・エレメントをコードしうる。特に、本発明の方法の各ピクチャー・エレメントは、一般的に半径0.1-1 μm および長さ1-3 μm を有するポアソン分布空間エレメントに相当する。この相関関数は所定の時間以内に各ピクチャー・エレメント内で計算され、各軸X、Y、Zについて蓄積される。その後、この調製物は新しい座標点にピエゾ素子で移動されることが望ましい。この調製物を移動させる代わりに、例えばレーザー光を所定の限度内に適当な鏡装置で動かすこともできる(第9 図参照)。ダイナミック・ピクチャー・エレメントはコンピュータで1つの像に組み立てることができる。

第6 図は試料容積および測定容積に関する電氣的分子トラップを用いた光学検出ユニットの望ましい配置を示している。1つまたは2つの検出器(検出器1/2)はテキストに示したように1つまたは2つの光学ユニットにより共焦点的に結像された測定容積エレメントからの蛍光シグナルを検出する。水性試料はエマージェンス・レンズの表面に直接接するか、または第3 図に示したように薄いシートで対物レンズから分離されている。

試料は約1 μm のキャピラリー末端の内径を有する少なくとも2つのキャピラリーの間に提供される。イオン性分子に対して分子トラップとして機能する場合、このキャピラリーは導電性表面層、望ましくはクロム・プライマー上の金でコーティングされており、そこに静電場または振動電場をかけることができる。電場の制御は光学検出ユニットと対応するコンピュータで行うことが望ましく、また、問題の分子が進入してきたとき、限定された方法で調節しうることを望ましい。

第3図は特定の適応度パラメータで大量の変異体をスクリーニングするための本発明に従った配置の望ましい態様を示している。試料は第6図に従った光学検出ユニットを用いて検定しうる。試料は水浸した対物レンズに接することが望ましいシート状表面下で液滴として存在する。このシートは特定のコーティングを施してあり、各試料由来の分子を表面に選択的に結合させうる。試料は、例えばマイクロディスペンシング・システムを用いて決まった位置に規則正しく置くこともできるし、ランダム分布として置くこともできる。試料からの溶媒の蒸発を防ぐために、液滴は保護マトリクス、例えばポリマーまたはオイルで囲むことができる。

第7図は選択された遺伝子型のFCS タギングを模式的に示している。特定の試料が第3図に従って予備選択した適応度パラメータに対応するなら、各容積セグメントへの接近は、例えば光学的にその位置をマークするか、または続いて試料への接近を可能にする光活性化可能なコーティングが提供されている表面により容易に行いうる。

選択された容積セグメント、または第8図に示したようにコードしている核酸等、中に含まれる分子への接近も、例えば核酸と反応するようにエレメント中の可溶性反応物を光活性化することで行いうる。このように標識された核酸は、さらに例えばPCR 反応を行うための単離を比較的簡単に行うことができる。

第11図は本発明の検定法の選択を示している。「Ag」は抗原を示しているが、例えば二本鎖構造で検出される核酸のような一般的な意味での分析物を示している。

「Ak」は抗体を示しているが、一般的には例えば抗体フラグメント、結合ドメイン、または分析物に相補的な核酸等、分析物に対する特異的テスト試薬を示している。

「F」は発光色素、特に蛍光色素を示している。

(A) 蛍光標識されたテスト試薬による分析物「Ag」の本発明に従う特異的複合体形成であって、複合体型の蛍光標識テスト試薬は本発明により遊離型のものと区別される。この一群は分析物の1000倍過剰まで許容される。

(B) しかし、(A)と同様に、非標識型の過剰に添加された第2のテスト試薬の結合は、小さすぎる複合体と非複合体型標識テスト試薬とのサイズの差を増加するのに使用される。

(C) 少量のテスト試薬および蛍光標識競合分析物の添加を用いた競合RIA 類似検定法。

(D) 過剰量のテスト試薬を用いた検定法であって、エネルギー転移により色素標識が特異的複合体形成を示す少なくとも2つの異なるテスト試薬が使用される。

(E) (D)と同様に、異なる色素を本発明に従って独立に検出し、共通の複合体の形成は異なる光学的シグナルの時間相関で測定される検定法。

第19図は、 n 個の反応混合物中の n 個のレセプター分子に由来し、かつ、色素標識リガンドを含む複合体が平行した実験においてどのような解離挙動を示しうるかを表している。限定した時間間隔でいくつかの反応混合物を反復して分析する。最初は、過剰量の非標識リガンドを混合物に添加し、解離したどの複合体も非標識リガンドとの複合体を再び形成するようにする。曲線1、3 および n から各解離速度定数が見積もられ、曲線2 および $n-1$ は2つの区別可能な解離過程を明らかにし、かつ区別可能なレセプターを示している。

第20図は本発明の電氣的トラップの種々の態様を示している。(a) a, b, c, d は四極子電極を示している（金属被覆ネハーキャピラリーまたは平坦試料キャリアー（シリコン、硝子およびその他の基剤）上の微細構造に金属蒸着した電極）；六極子電極の場合（例えば1つまたは2つの対物レンズの金属蒸着したエマージェンス・レンズ）。調整は x, y, z 方向で行う。(b) エッチングした電極チャンネルを有する平坦キャリアー、または電場内で荷電分子の運動をコントロールしうるLIGA技術で調製したキャリアーの使用。e およびf の底板は六極子電極同様に被覆した、または金属蒸着カバーで被覆した対物レンズでありうる。(c) キャピラリー末端の電極（約 $\pm 0-100V$ ）および接地電圧（0V）の電極を含む大容量受容のための鉋物（例えば、硝子、シリコン、または電気浸透キャピラリー効果を防ぐテフロン等のプラスチック）からできたキャピラリー。

第21図は電氣的トラップによる荷電分子の検出の可能性を説明している。(a)

もしターゲット分子が四極子または六極子電場内に存在するなら、その分子は電極a,b,c,d 上のランダム振動電場で強制運動を起こさせられる。これらは本発明にしたがって計数しうる。(b) トラップ内の分子の位置はマルチエレメント検出器で認識しうる。正のフィードバックで四極子／六極子電場を調整し、分子ジェット(gets)は決まった領域／容積エレメント内の位置に固定される。

第22図はウイルスゲノムに流行病学的に保存されている遺伝子セグメントの分析を示している。種々のウイルス種のDNA/RNA 混合物はセグメント毎、各々標識化したカウンター鎖プローブで標識し、過剰の非標識プローブによる置換実験に使用する。融解温度以下での遊離した標識プローブの迅速な出現は、多くのウイルス種が多くのミスマッチを含んでプローブと複合体を形成していることを示している。これらの領域では、ウイルス種は明らかに非常に不均一である。

第23図では、相互相関によって同時にゲノムセグメント上のいくつかの突然変異の少なくとも1つの存在を示すための本発明の方法を説明している。非標識フラグメントの混合物を分析するDNA またはRNA 混合物に添加する。色素F2を含むプローブP のハイブリダイゼーションは、もし検索している突然変異の1つが存在するならば、色素F1で標識した少なくとも1つのプローブm1-m6 の同時のハイブリダイゼーションと相関していなければならない。プローブm1-m6 は変異した配列に各々相補的であり、ストリンジェント条件下野生型配列の二本鎖構造は効率的に形成できない。分析する核酸の望ましい濃度は $10^{-10} - 10^{-14}$ Mであり、一方プローブは望ましくは $10^{-8} - 10^{-11}$ Mの濃度で提供される。

第24図は本発明の小さい励起容積(a)、小さい測定容積(b) および平行測定の小さい容積(c) を示している。(a) プレ・フォーカス無しの励起光の断面図が本発明の小さい測定容積の像と共に示されている。色素標識の光不活性化が実際の測定容積に入る前に起こり、測定容積内の有効濃度が実際の濃度よりも低くなる領域が形成される。このことはプレ・フォーカスした励起光を照射し、かつ対物板中のピンホール開口で結像することにより大部分防止された。光強度がガウス分布しているガウス容積が形成される(b)。(c) は小さい測定容積の望ましい像と共にプレ・フォーカスを伴う平行照射励起光の断片、または試料容積内の種々

の空間座標を持つ種々の容積エレメントの連続照射および測定を示している。

【図1】

レセプター検定法(1)

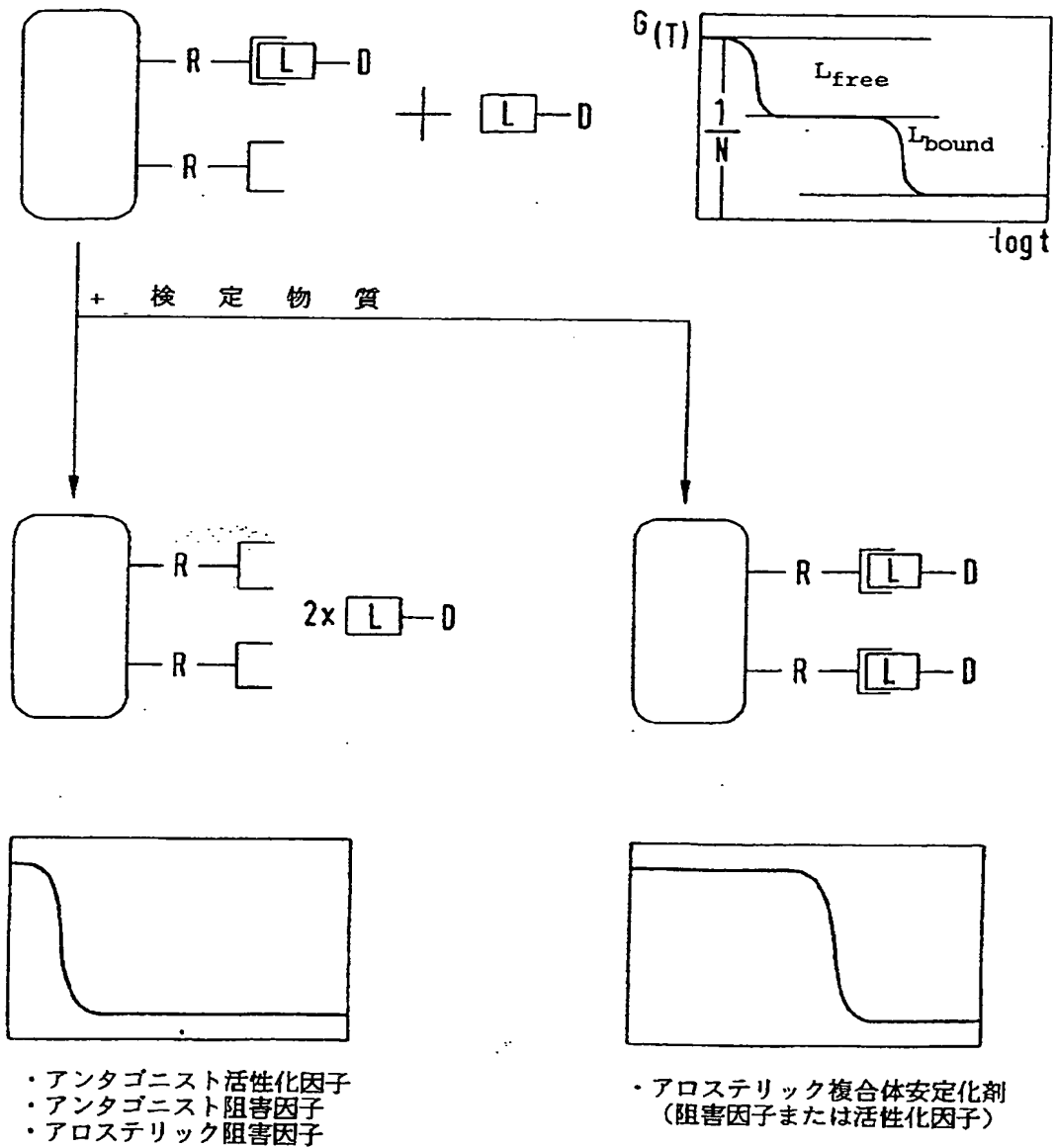


FIG.1

【図2】

レセプター検定法(2)

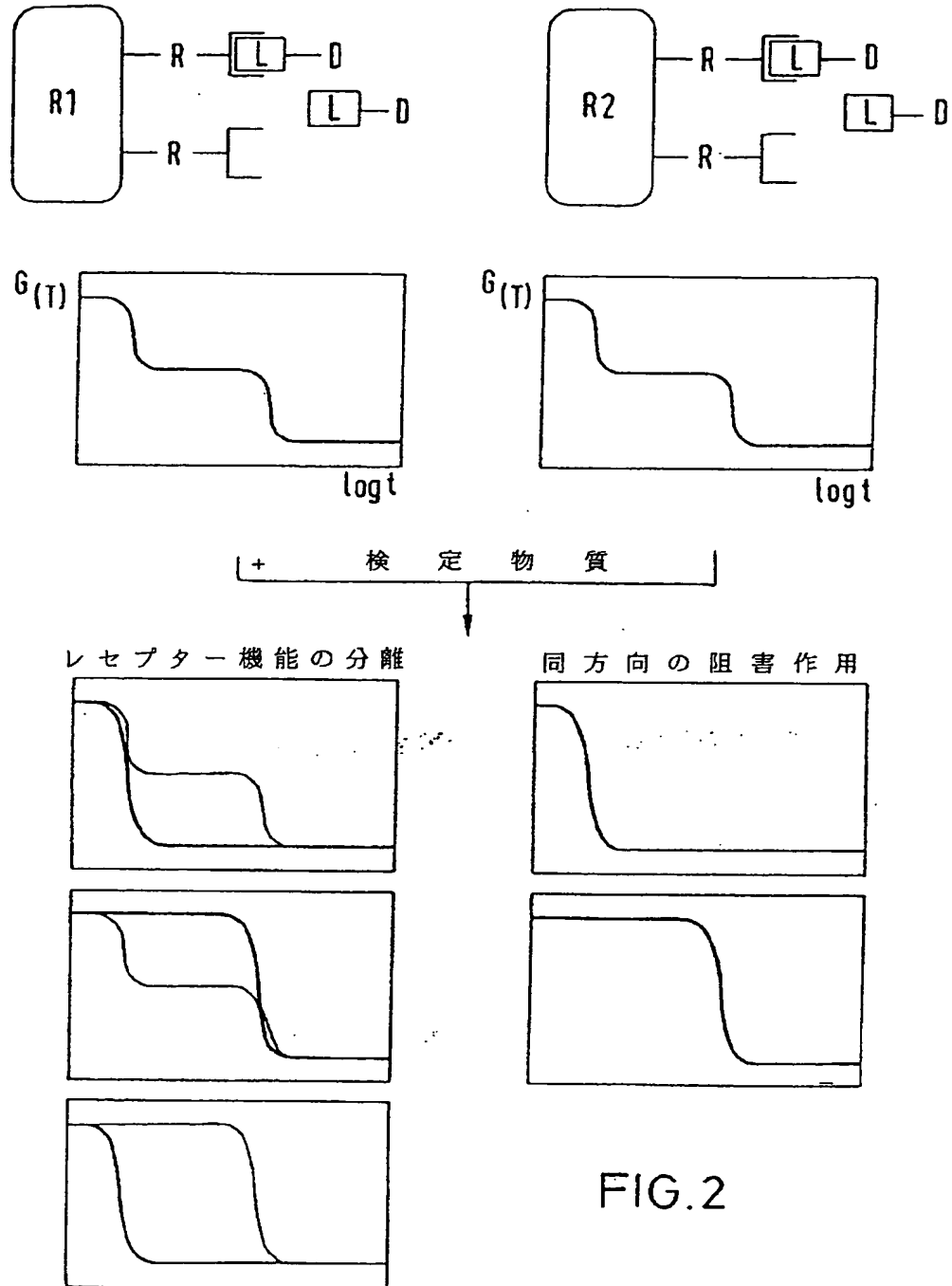


FIG.2

【図3】

マルチウェルシートを用いたFCS分析

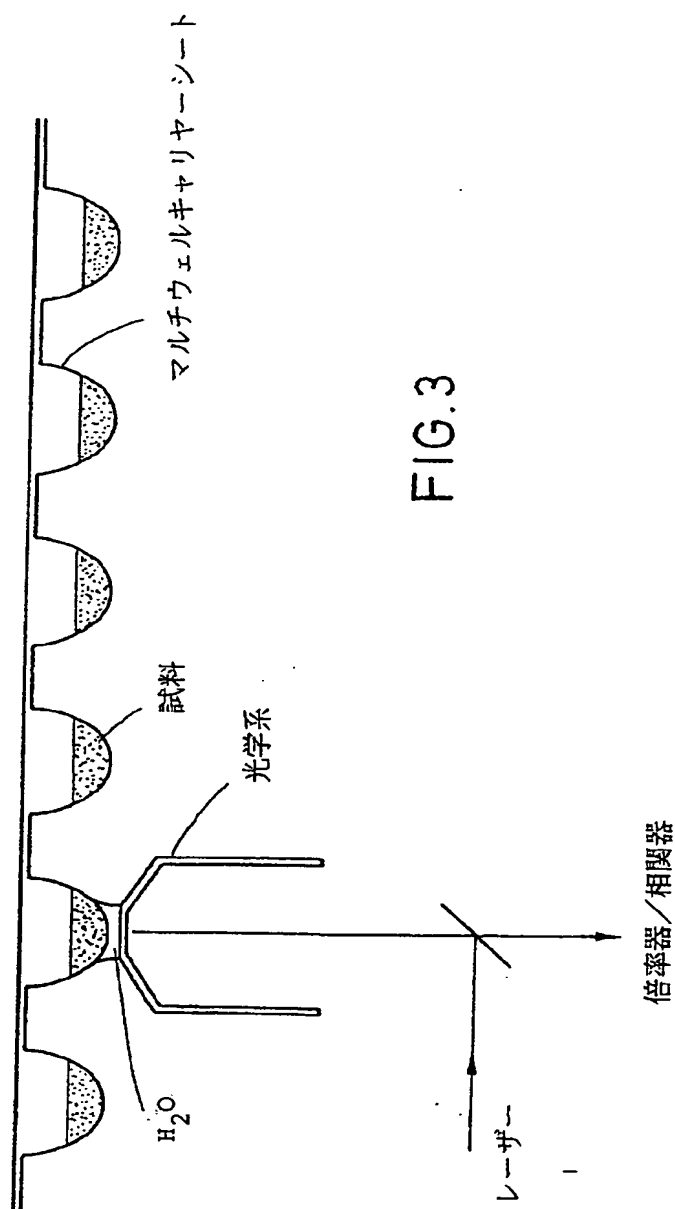


FIG.3

【図4】

変異体淘汰値のFCS測定

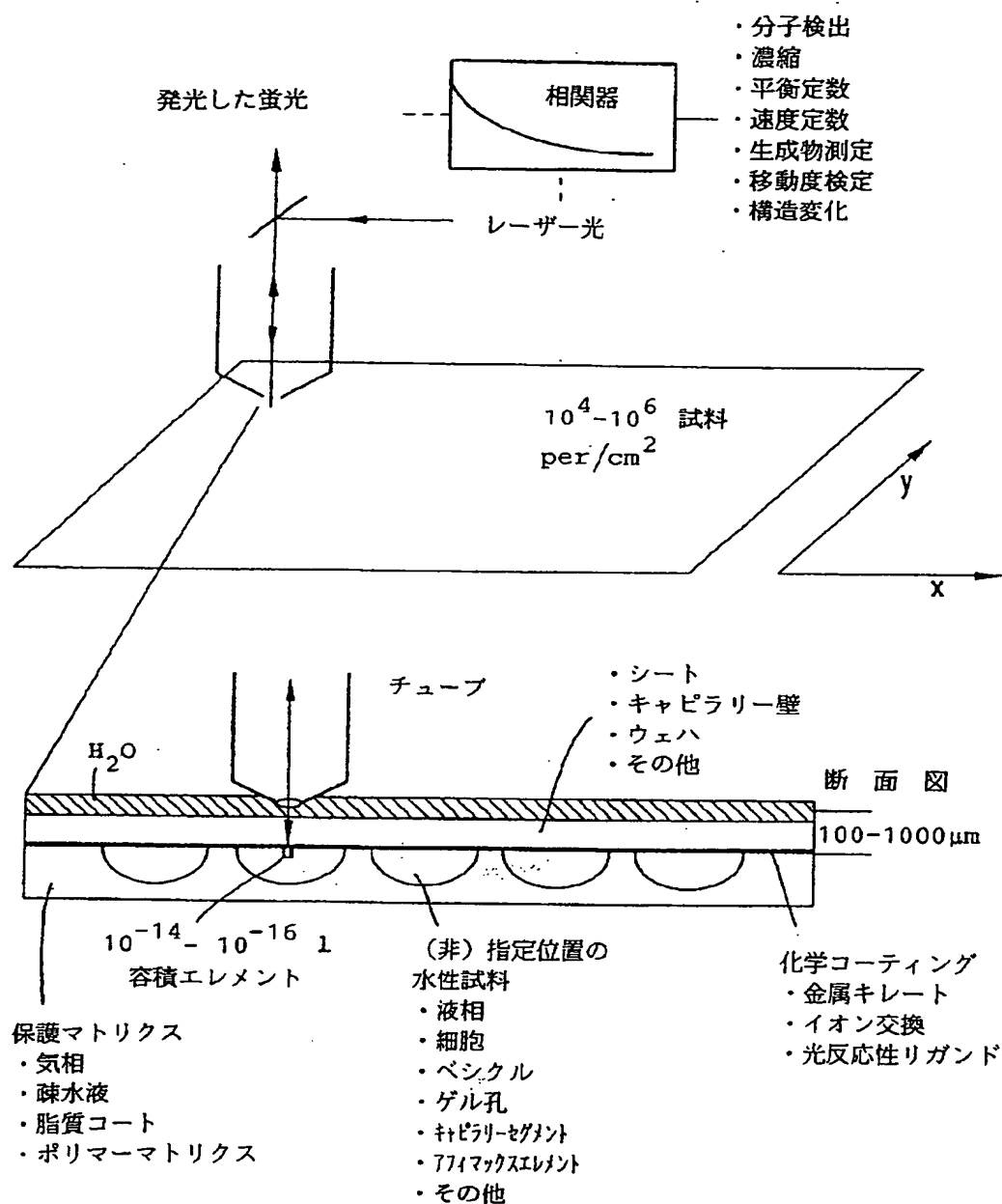


FIG. 4

【図5】

測定容積の位置座標の
相対的時間変化による
定常構造中の分子の検出

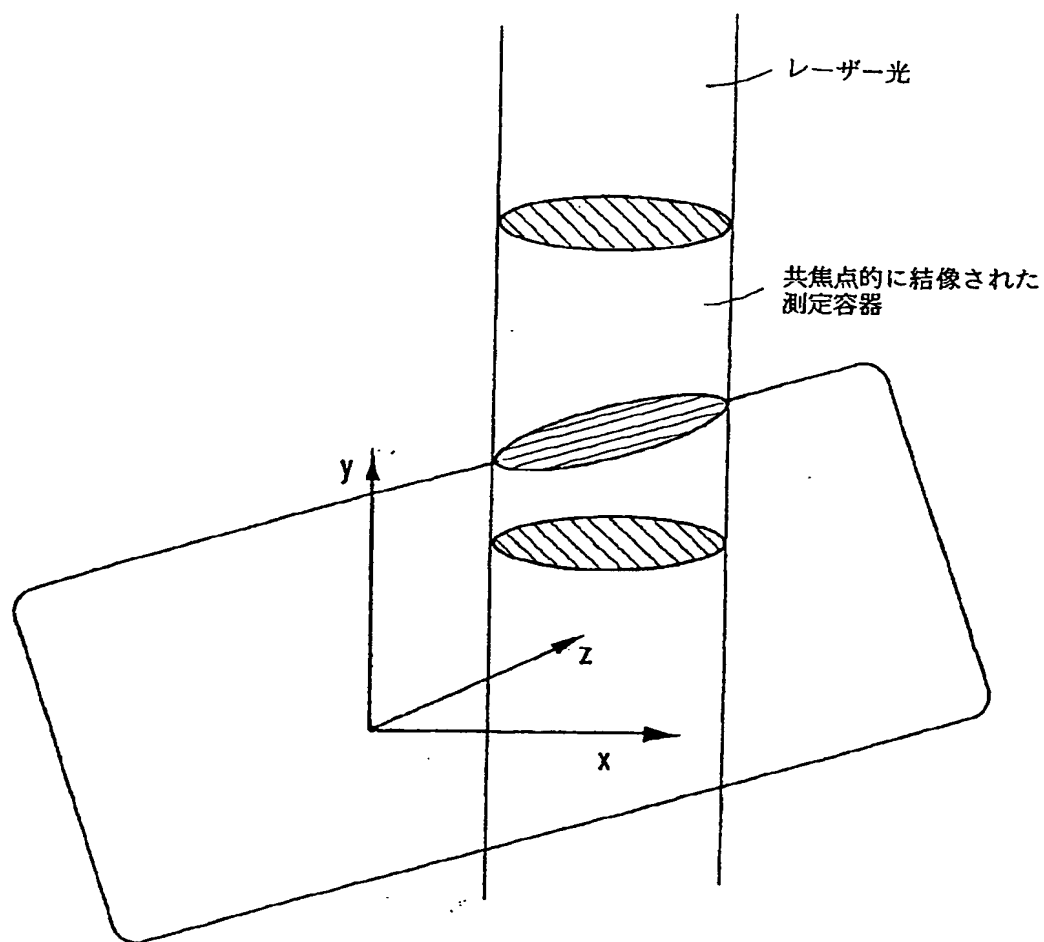


FIG.5

【図6】

電子トラップ中の単一分子の検出

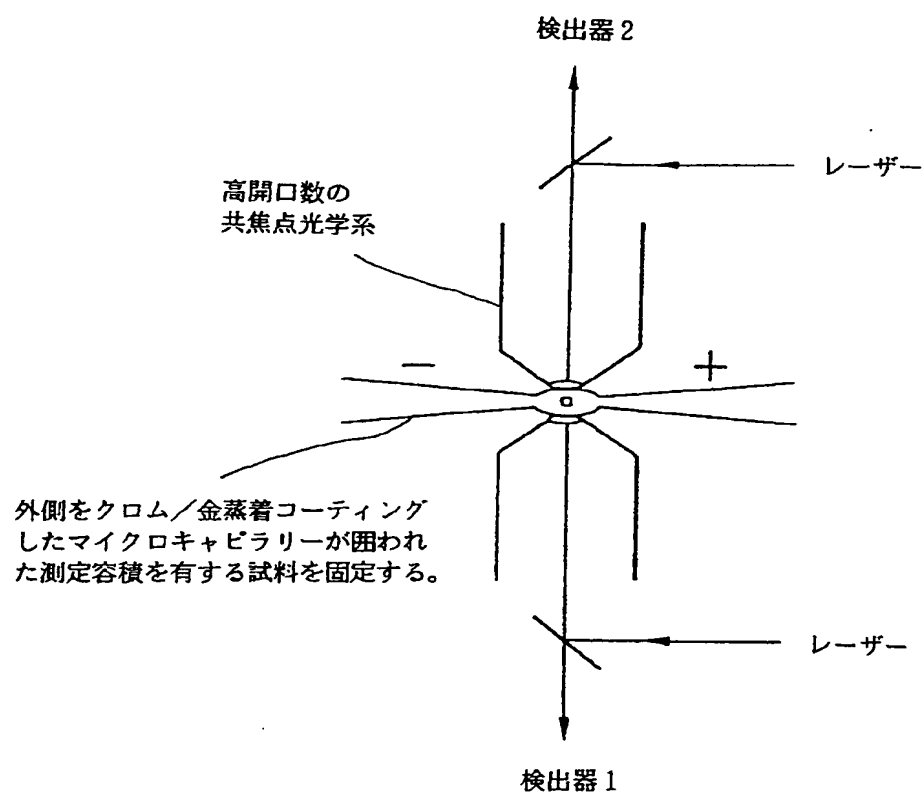


FIG.6

【図 7】

選択された遺伝子型の FCS タギング

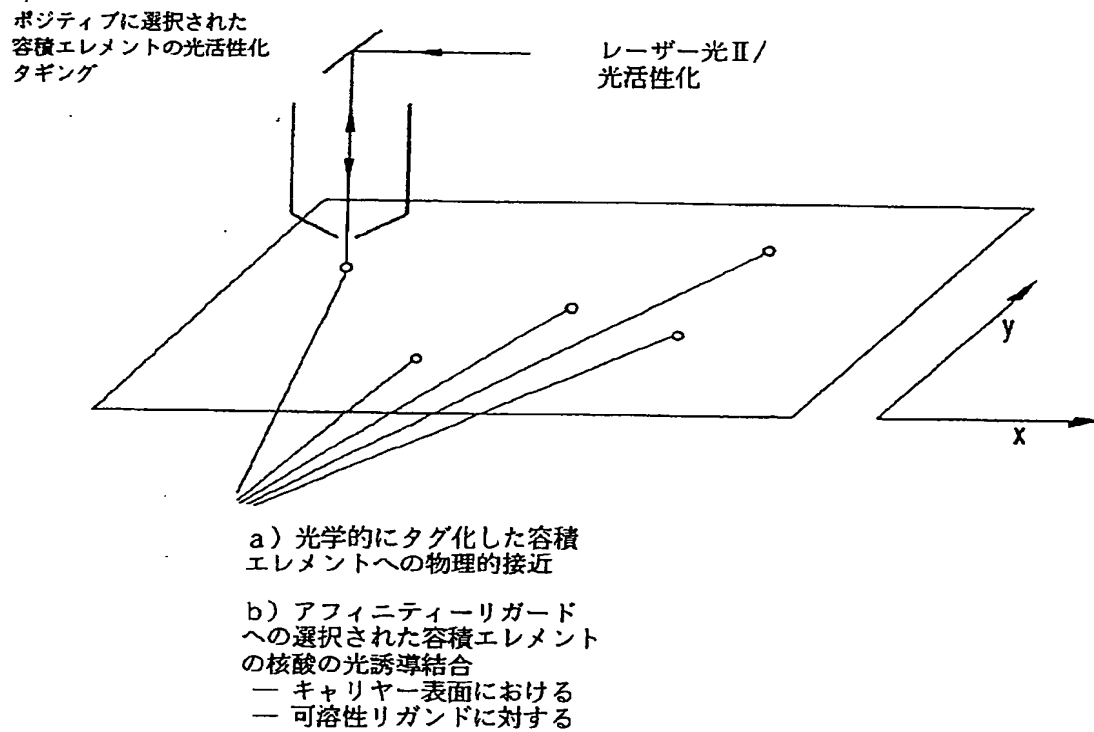
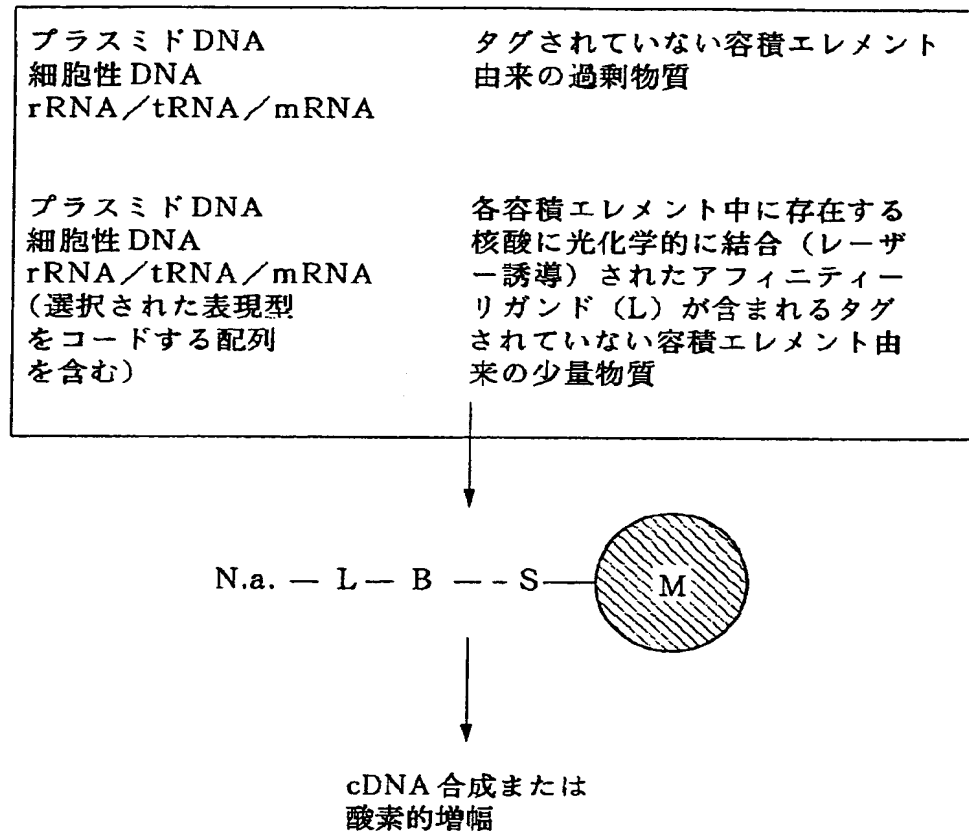


FIG. 7

【図8】

F C S 選択された遺伝子型の DNA/RNAの調製

表現型評価後の全ての核酸の混合物



N.a.; 核酸

L: 核酸に対して光化学的に、望ましくは可逆的に共有結合しうる (例えばソラレン誘導体) 特異的核酸アフィニティを有するリガンド。リガンドは核酸の濃縮が可能な置換基に結合していることが望ましい。置換基には、例えば、逆相クロマトグラフィーで核酸を精製しうる疎水性置換基がある。アフィニティ・クロマトグラフィーには、ビオチン (B) 等の置換基が適しており、核酸は適当に修飾した磁性ビーズ (M) または表面上の (ストレプト) アビジン複合体を形成することで濃縮しうる。

FIG.8

【図9】

フラクションにクロマトグラフィーで
分離した後の複雑な物質混合物の
FLUCS分析

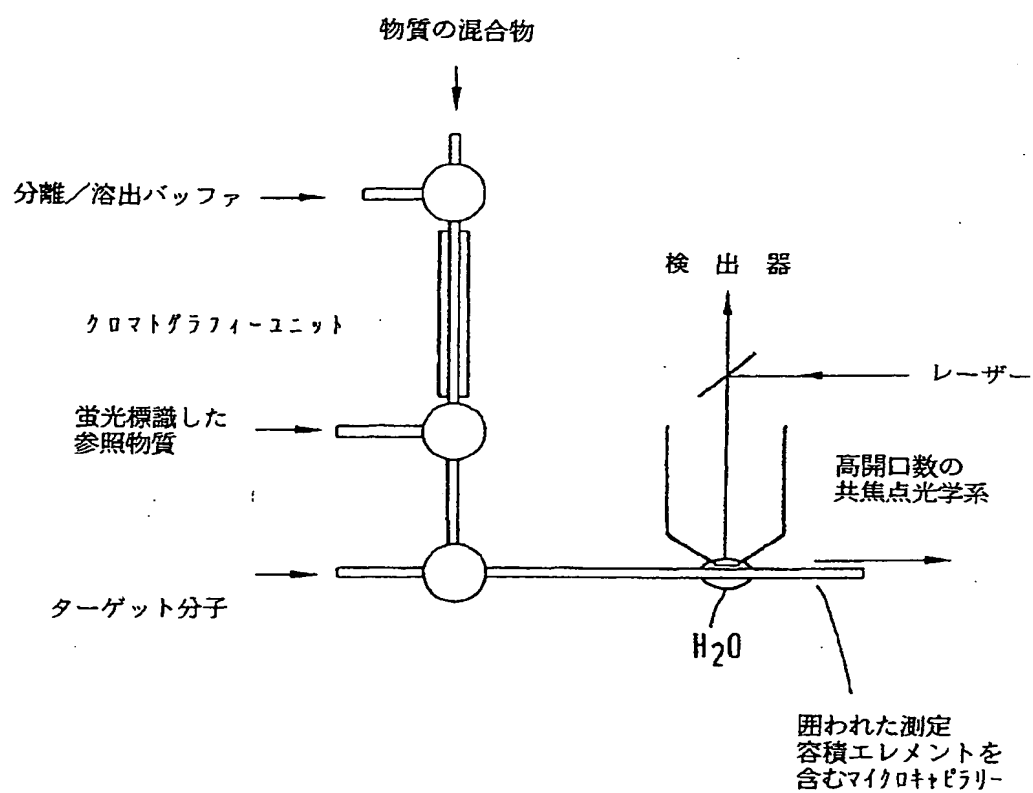
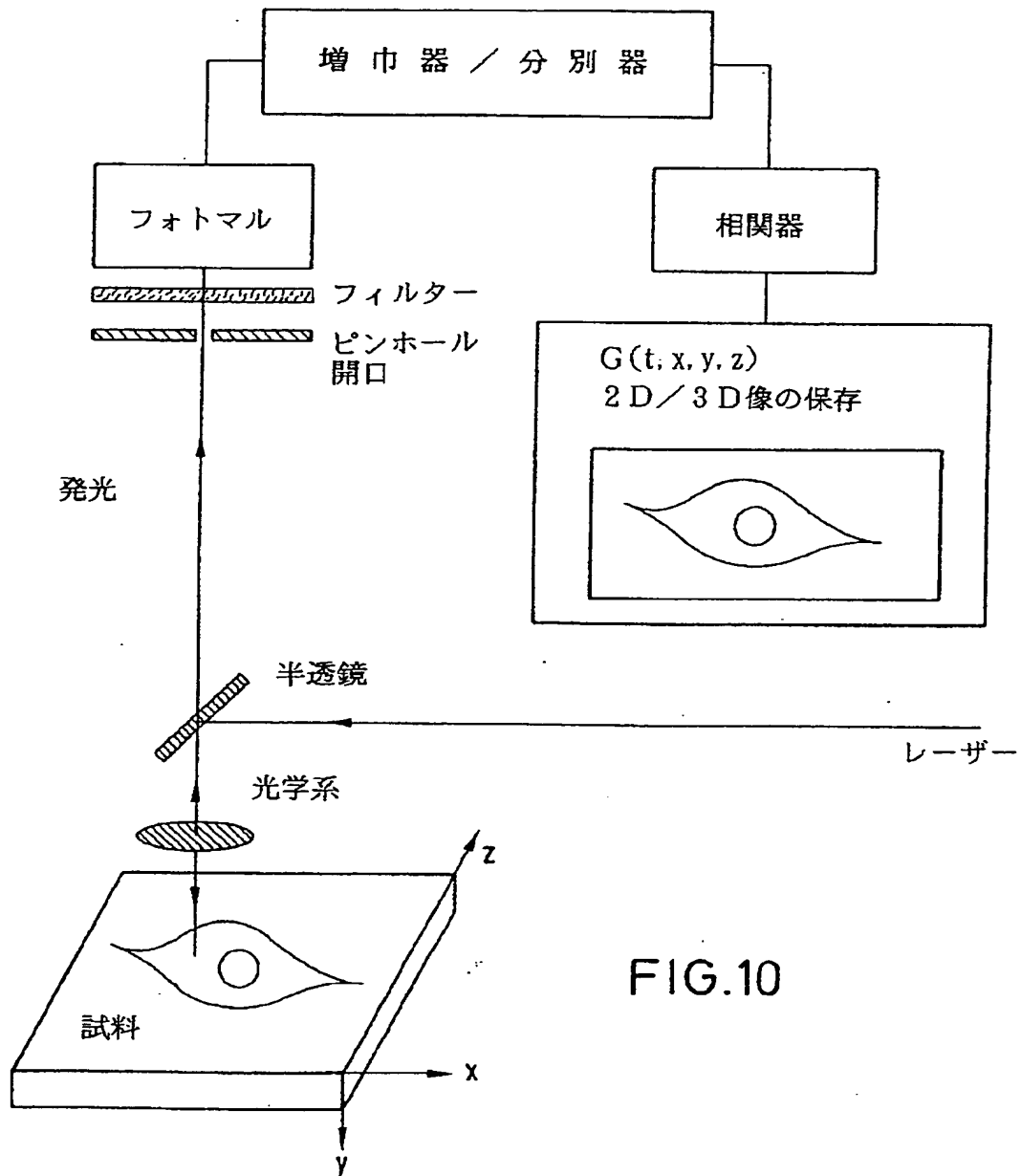


FIG.9

【図10】

レーザー相関顕微鏡



検定法の選択

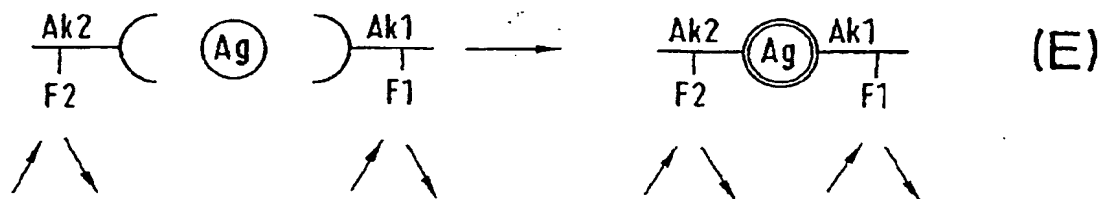
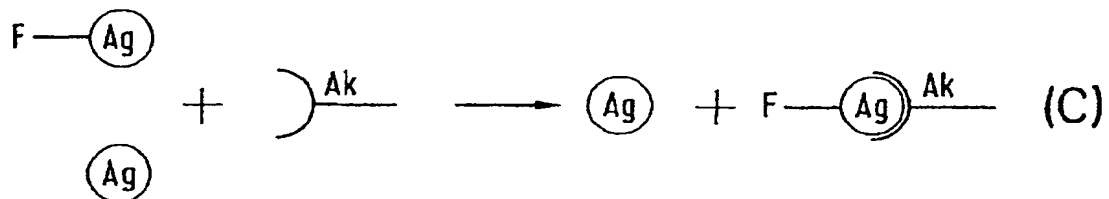
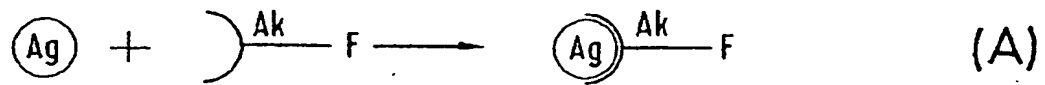


FIG.11

【図 12】

電 気 泳 動 セ ル

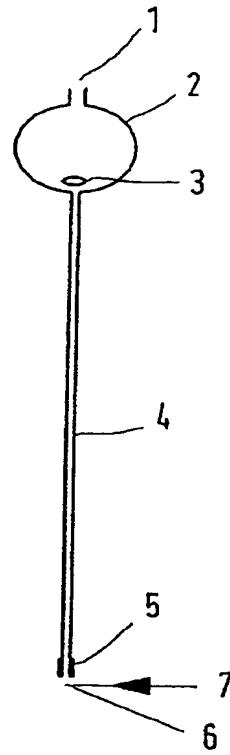


FIG.12

【図13】

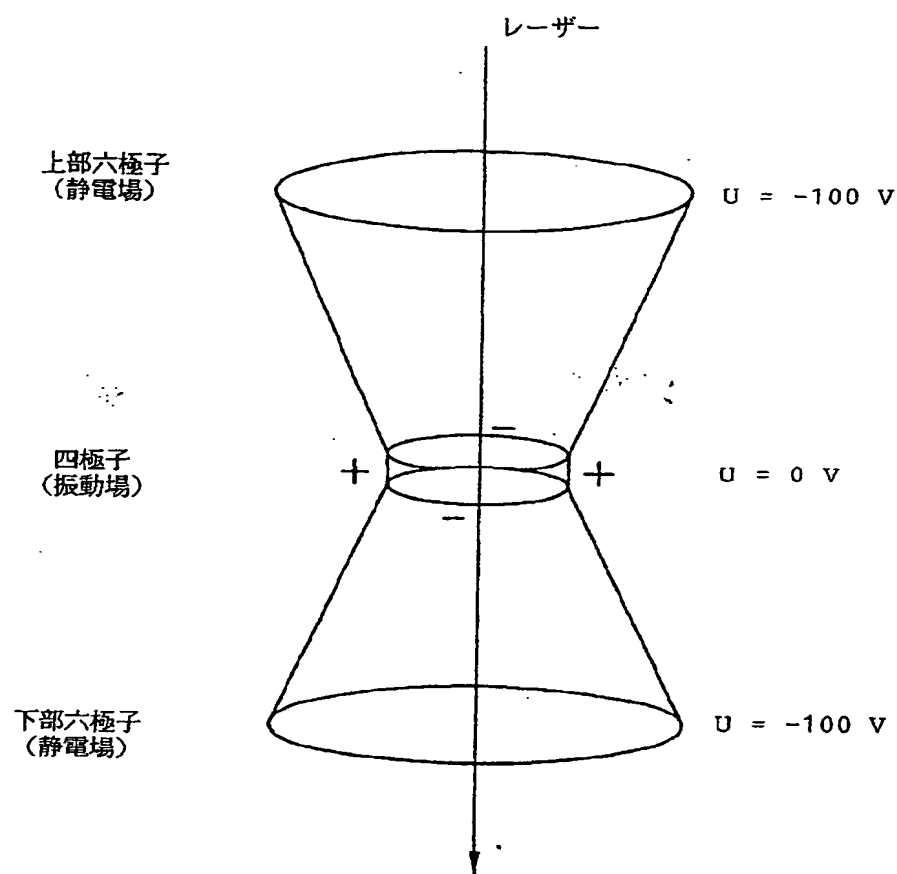


FIG.13

【図14】

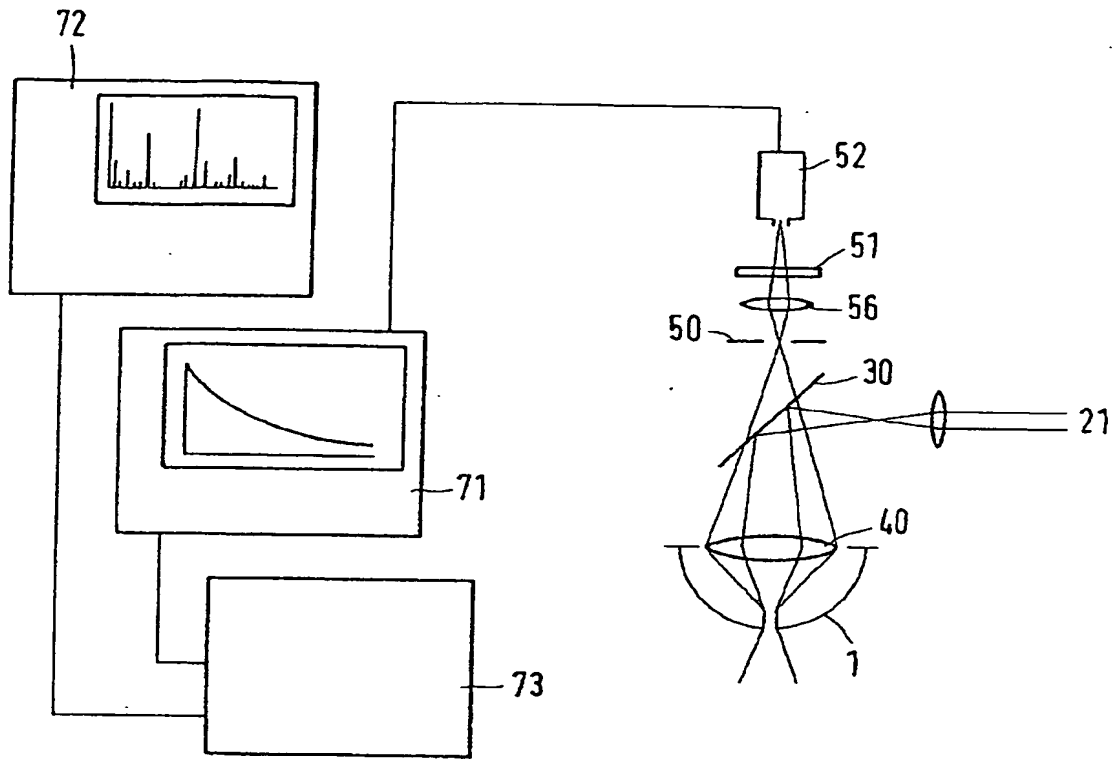
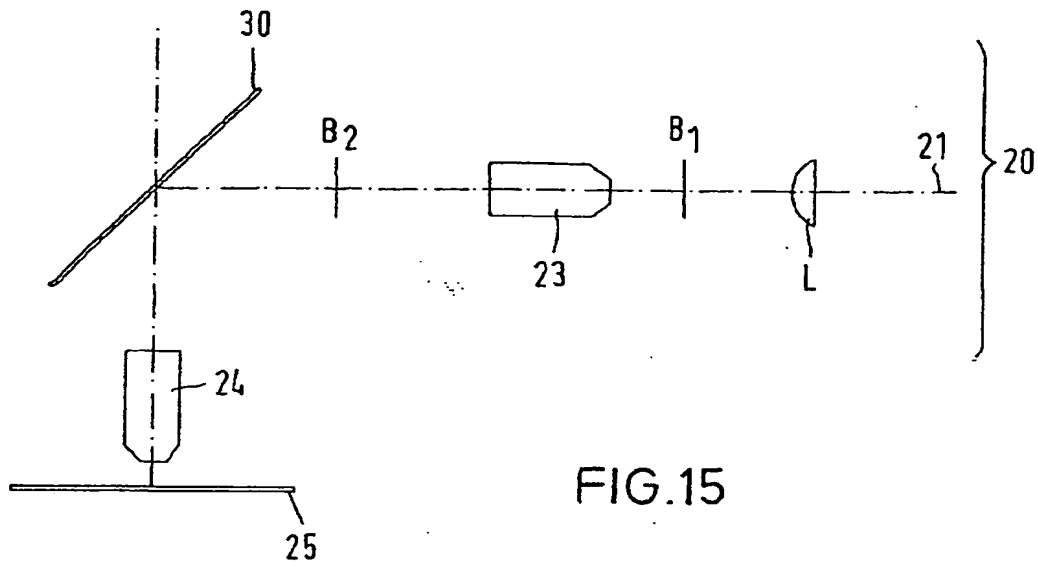
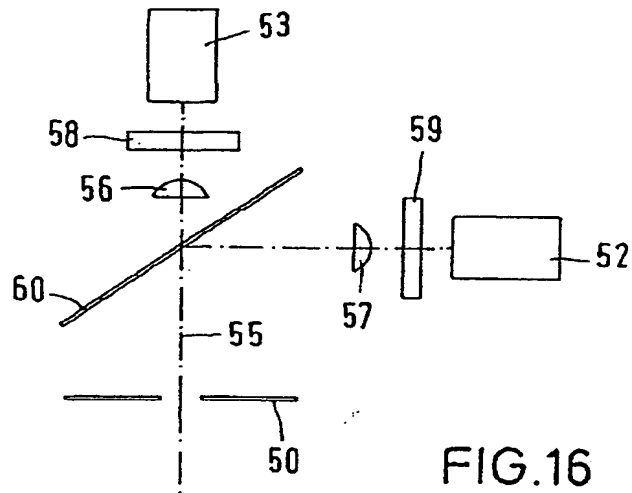


FIG.14

【図15】



【図16】



【図17】

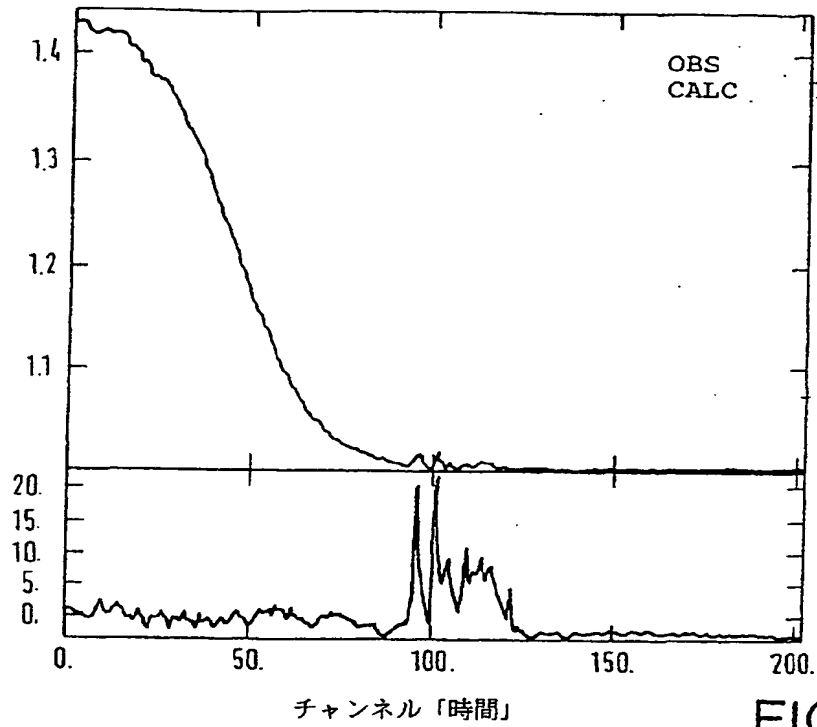


FIG.17a

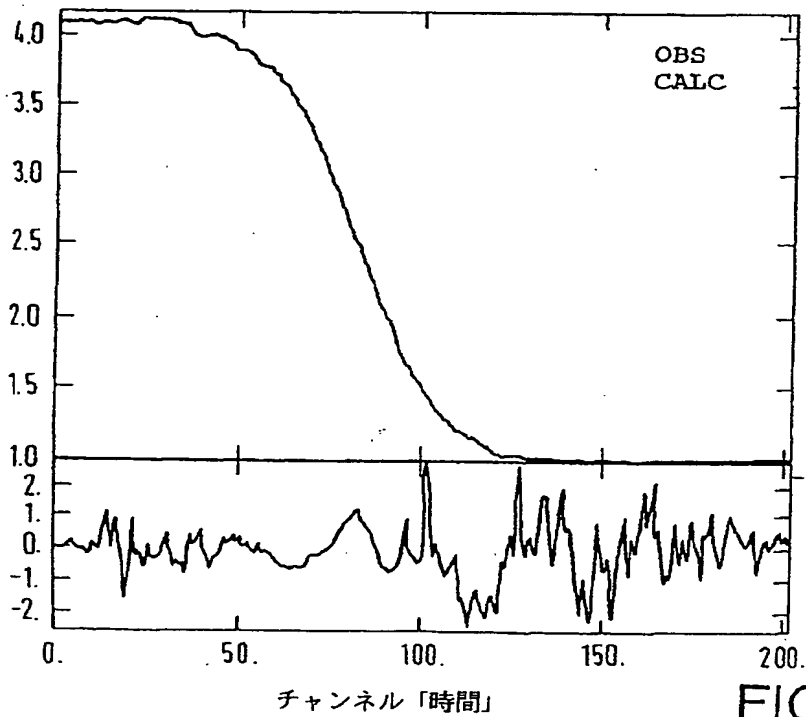


FIG.17b

【図18】

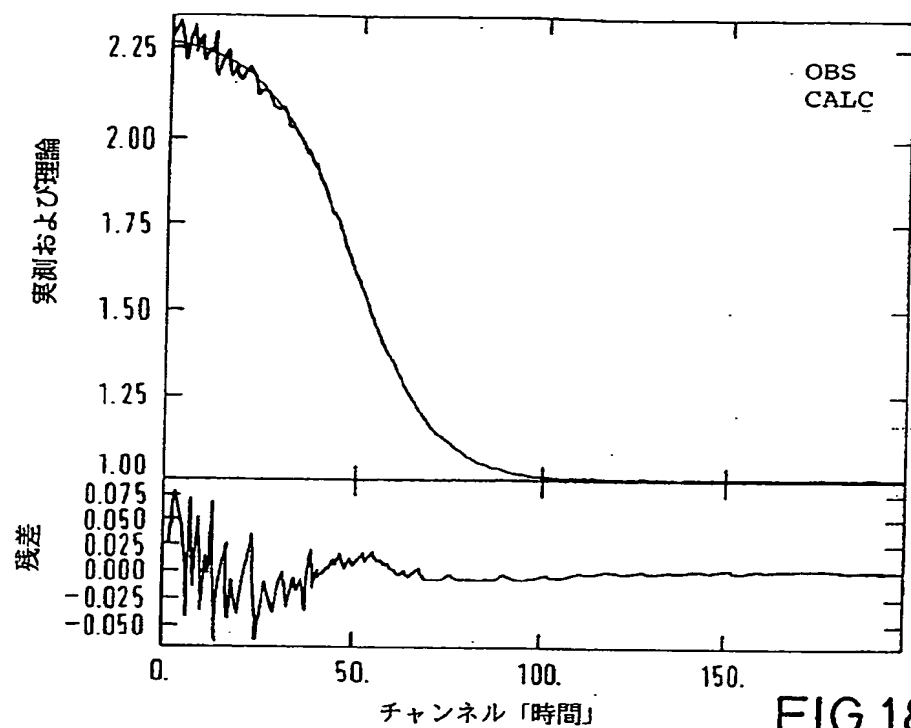


FIG.18a

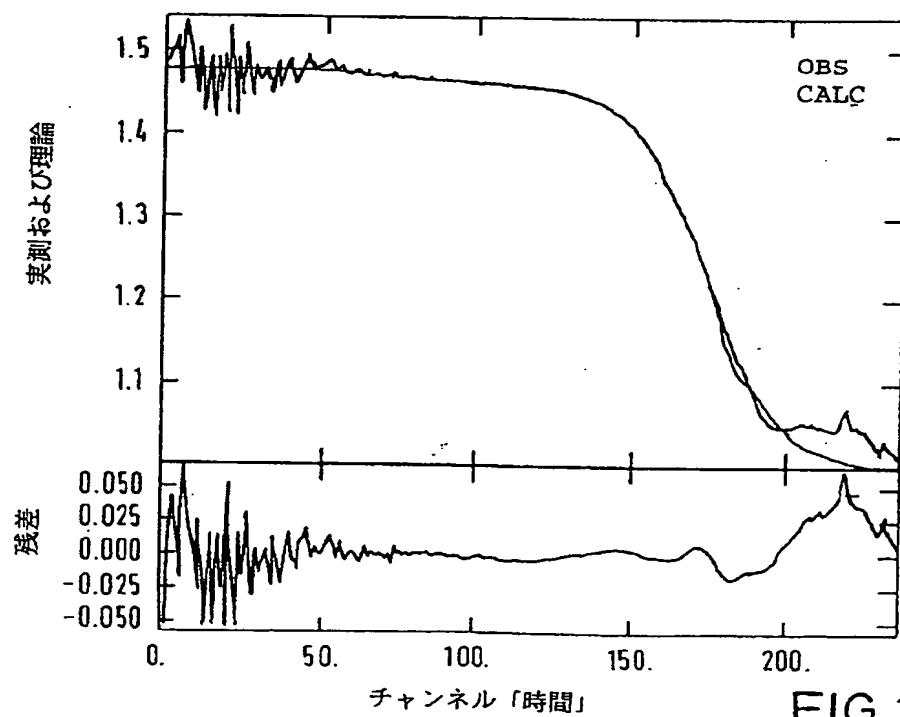


FIG.18b

【図18】

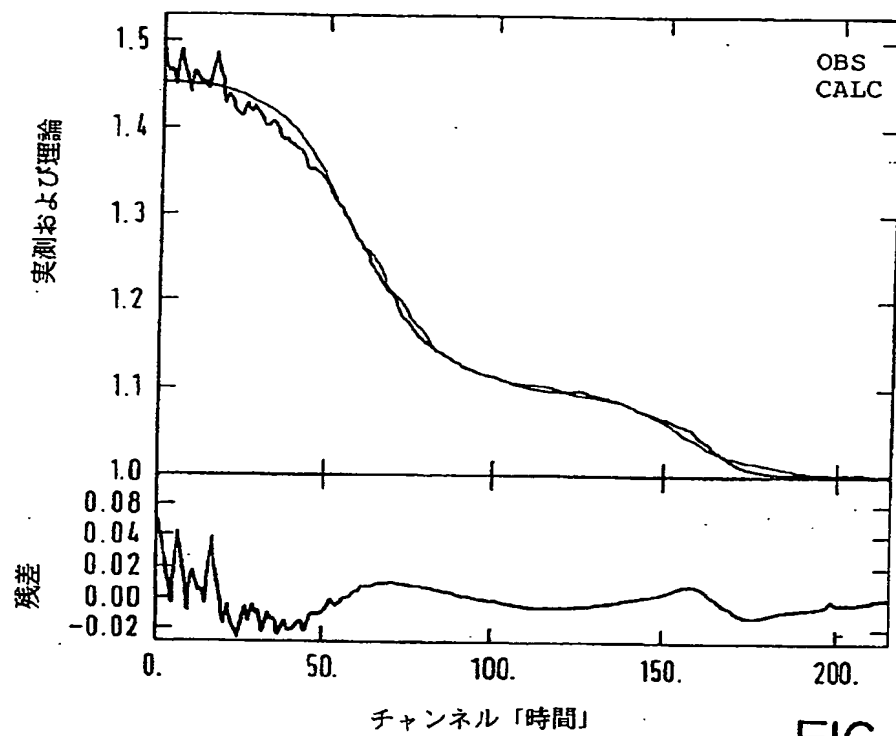


FIG.18c

【図19】

平行して行った実験における複合体の
解離挙動のFCSによる測定

反応混合物

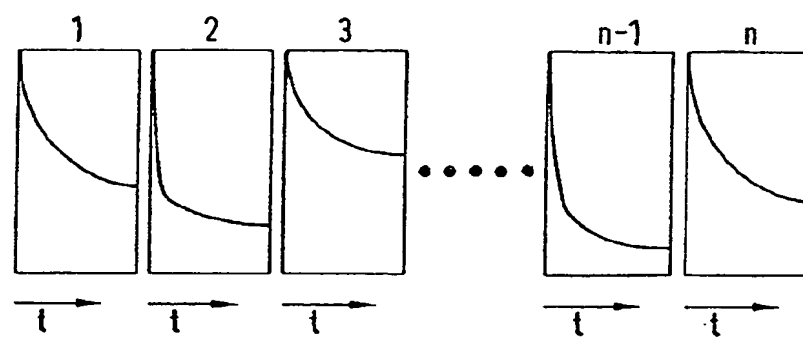
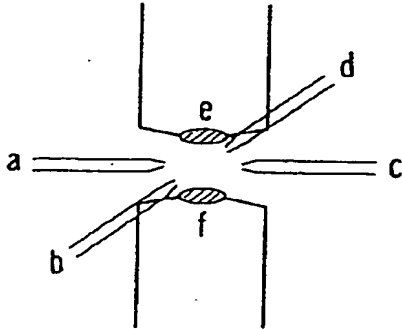


FIG.19

【図20】

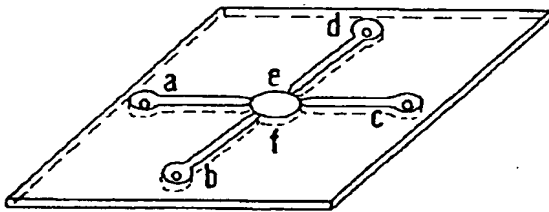
本発明による電氣的トラップの異なる態様

FIG.20a



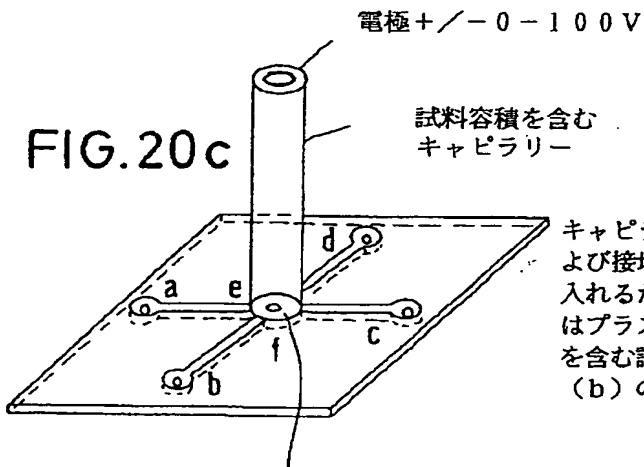
四極子電極としてのa, b, c, d(金属コートネハーチップまたは平坦試料キャリアー(シリコン, ガラス, その他の基材)上の微細構造上に金属蒸着した電極)
六極子電極としてのe, f(例えば1つまたは2つの金属蒸着エマージェンス対物レンズ。調整はX, Y, Z方向に行う。)

FIG.20b



誘導電場における荷電粒子の移動をコントロールするエッチングした電極溝(またはLIGA技術で作製したもの)を有する平坦キャリアーの使用。eおよびfの位置の底板は六極子電極としてコートした対物レンズでも金属蒸着カバーでもよい。

FIG.20c



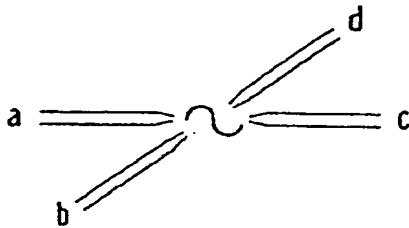
キャピラリー末端の電極(約+/-0-100V)および接地電極(0V)を有する大きい試料容積を受け入れるための鉤物(例えばガラス, シリコン他)またはプラスチック(テフロン等)からなるキャピラリーを含む試料ディスペンサー・システムを組み合わせた(b)の使用

アース(電圧0V)用の集合電極および四極子電場へイオンが通過するためのピンホール

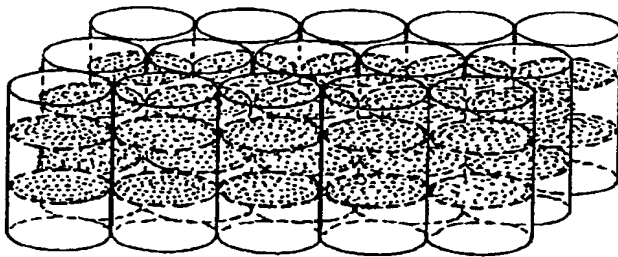
【図21】

分子検出

FIG.21a



ターゲット分子が四極子または六極子電場内に存在するなら、その分子は電極a, b, c, d 上のランダム振動電場により強制運動させることができる。



トラップ内の分子の位置はマルチエレメント検出器で認識することができる。アクティブフィードバックにより、四極子／六極子電場は調整され、分子は所定の領域／容積エレメント内の位置に固定される。

FIG.21b

【図22】

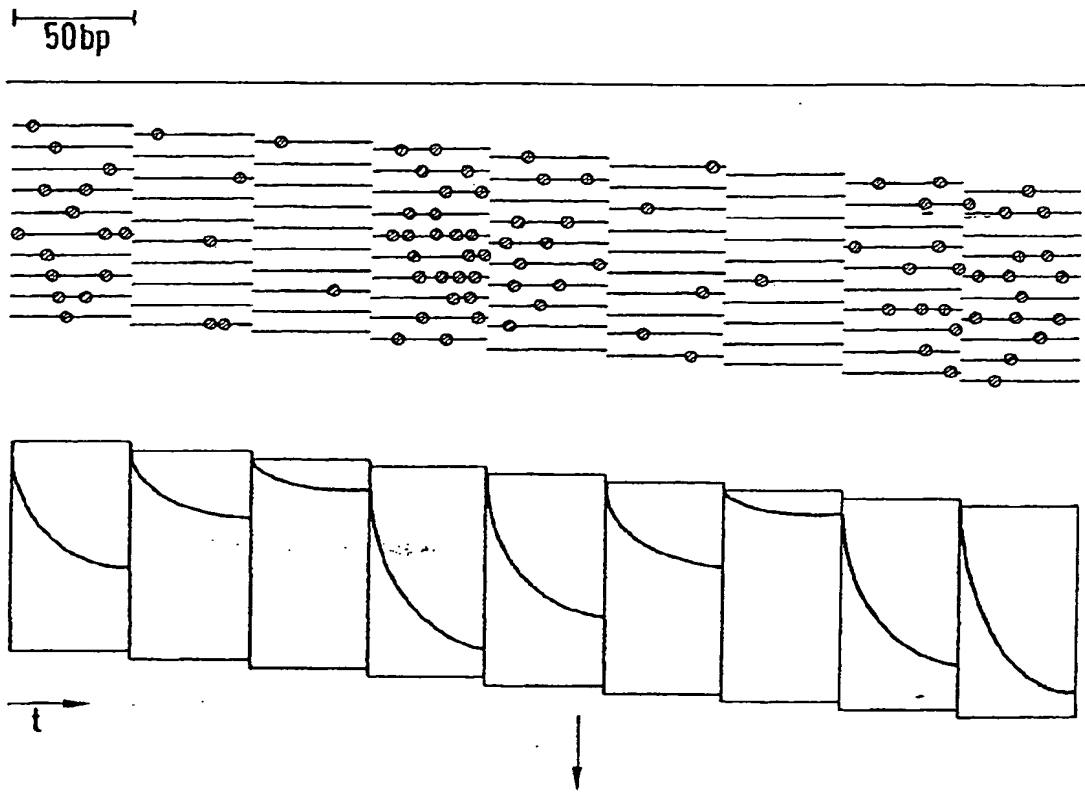


FIG.22

【図23】

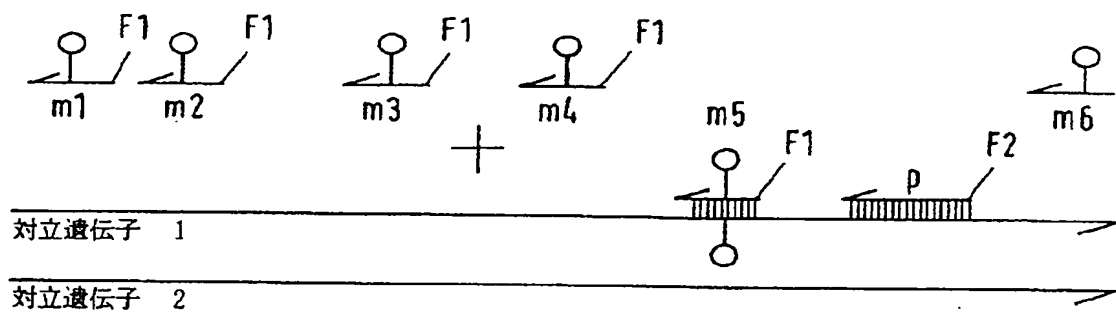


FIG.23

【図24】

小さい励起容積 (a) および小さい測定容積 (b)
 および平行測定のための小さい容積 (c)

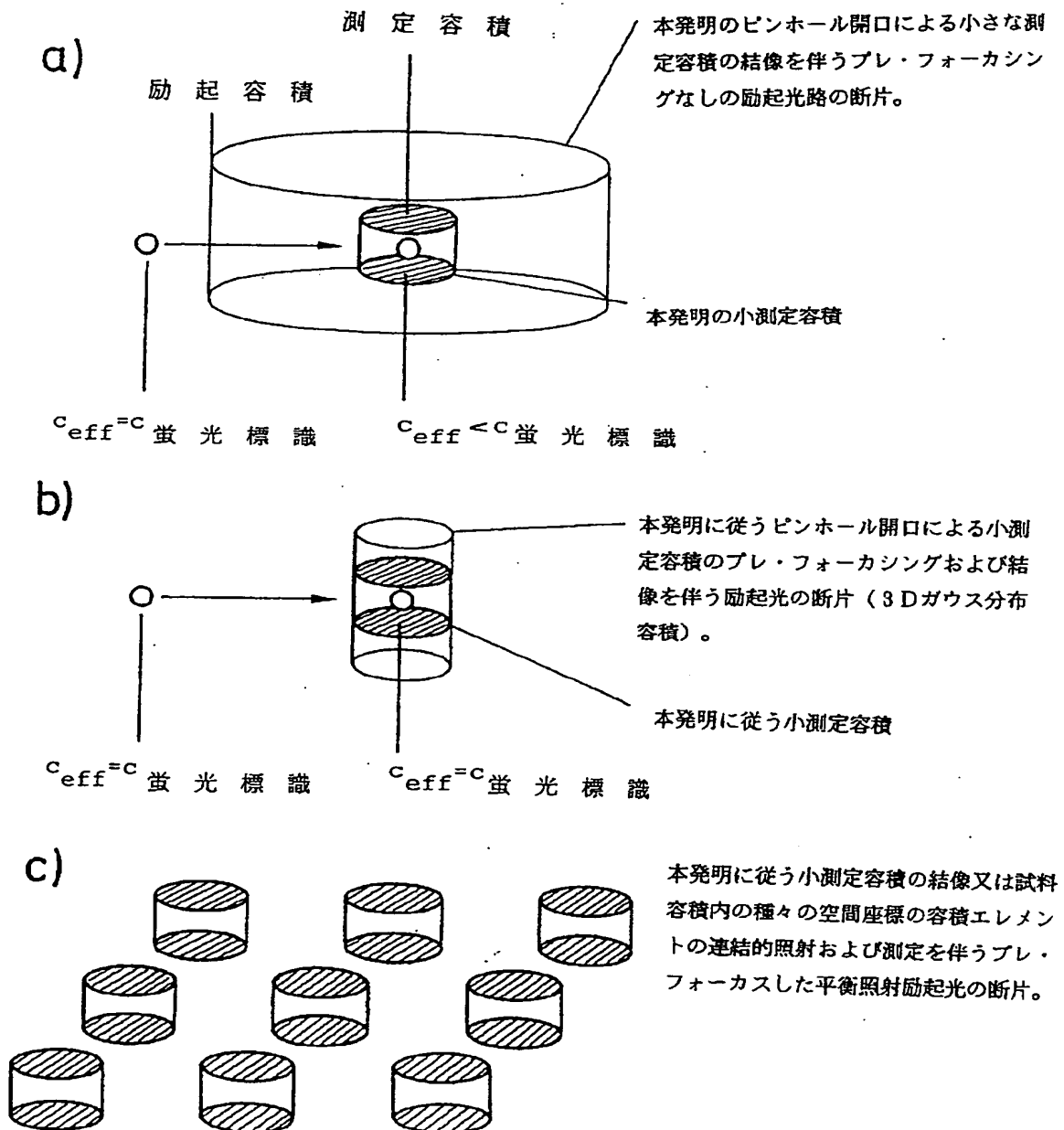
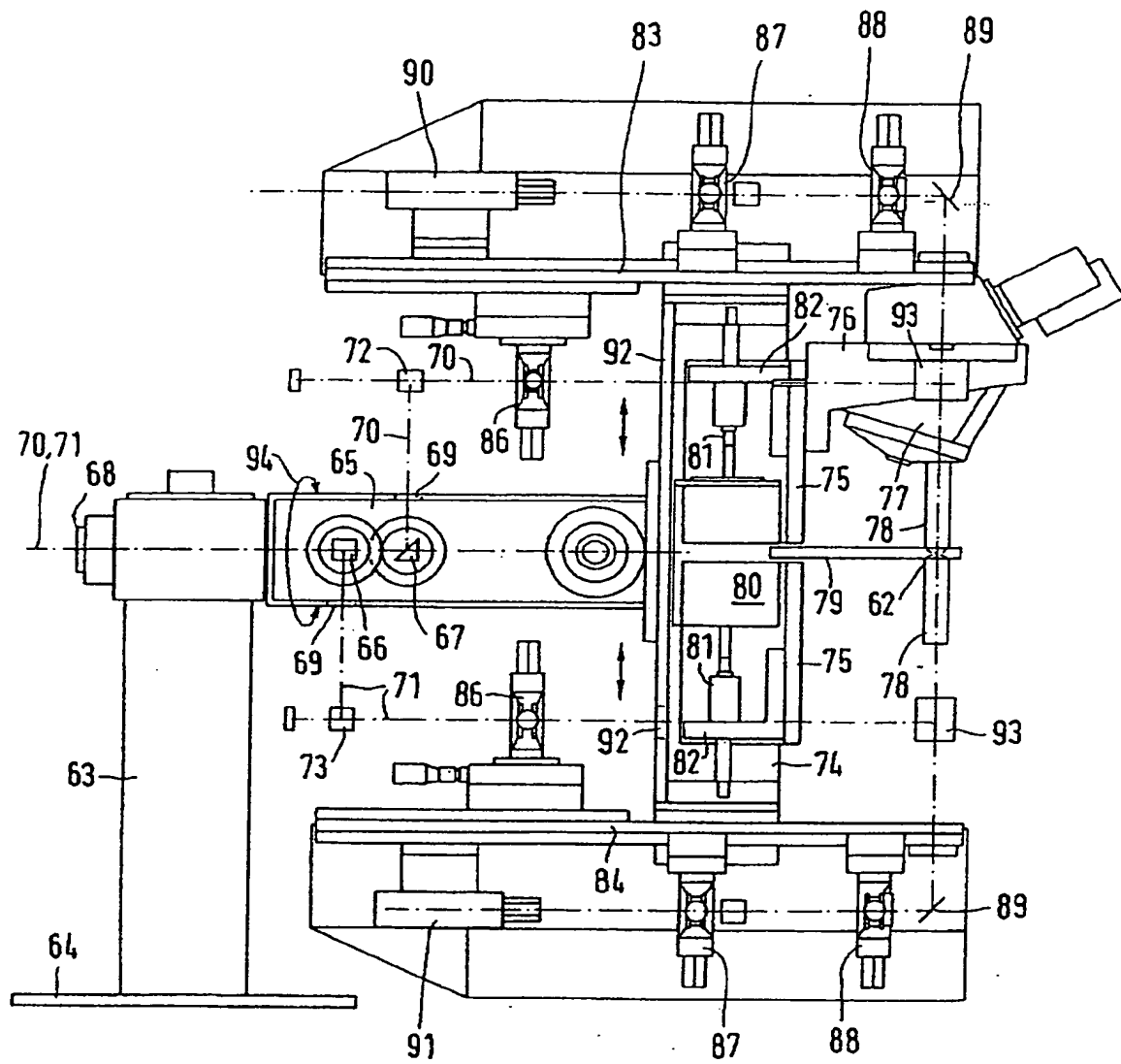


FIG.24

【図25】

FIG.25



【图 26】

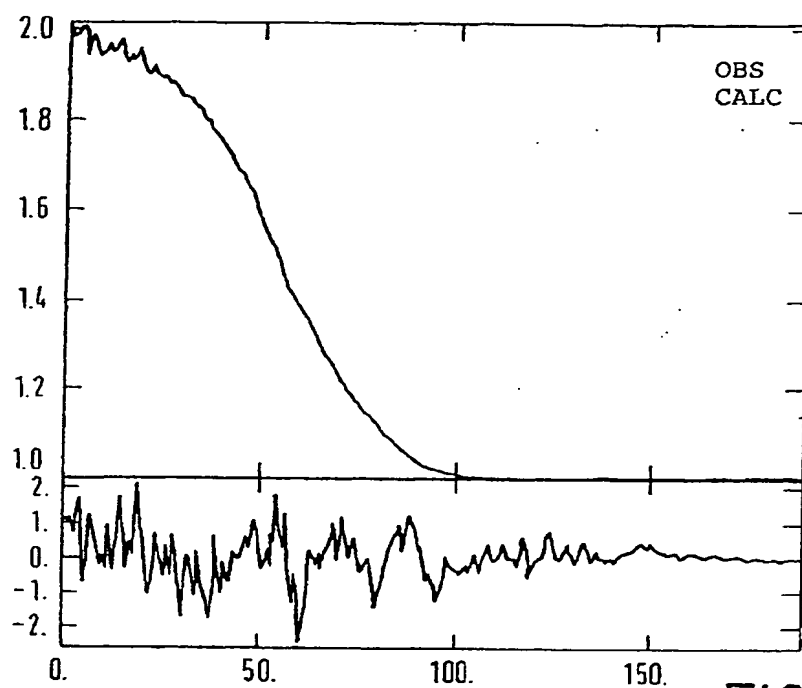


FIG.26a

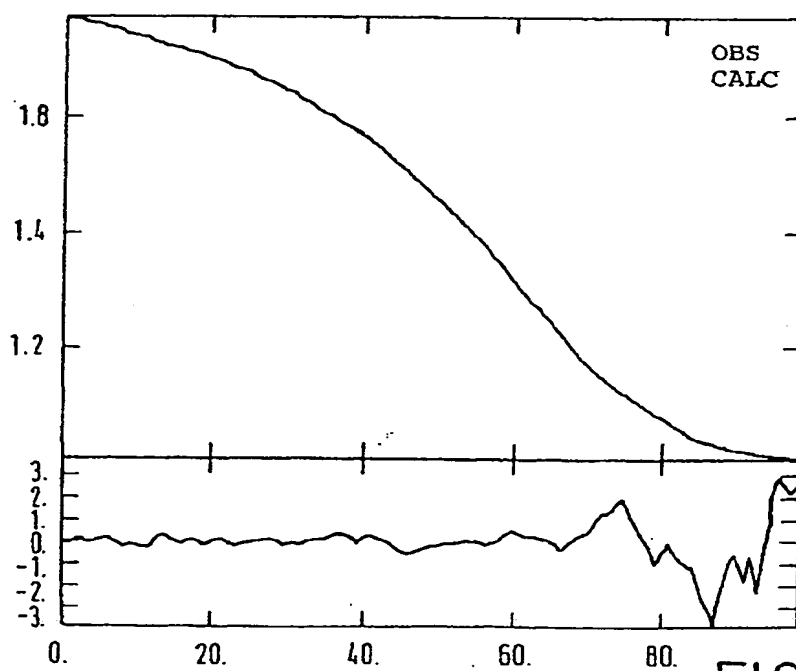


FIG.26b

【図26】

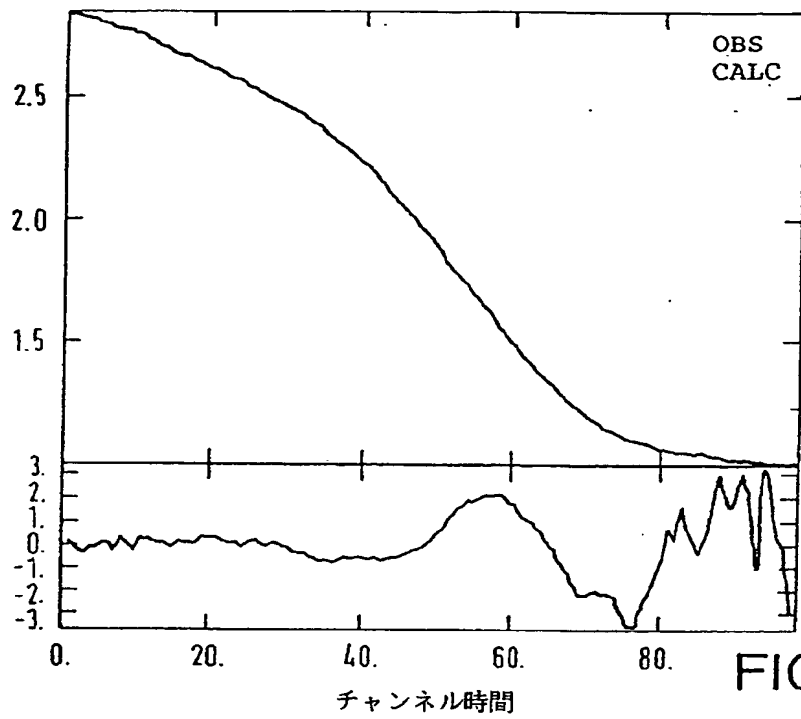


FIG.26c

【図27】

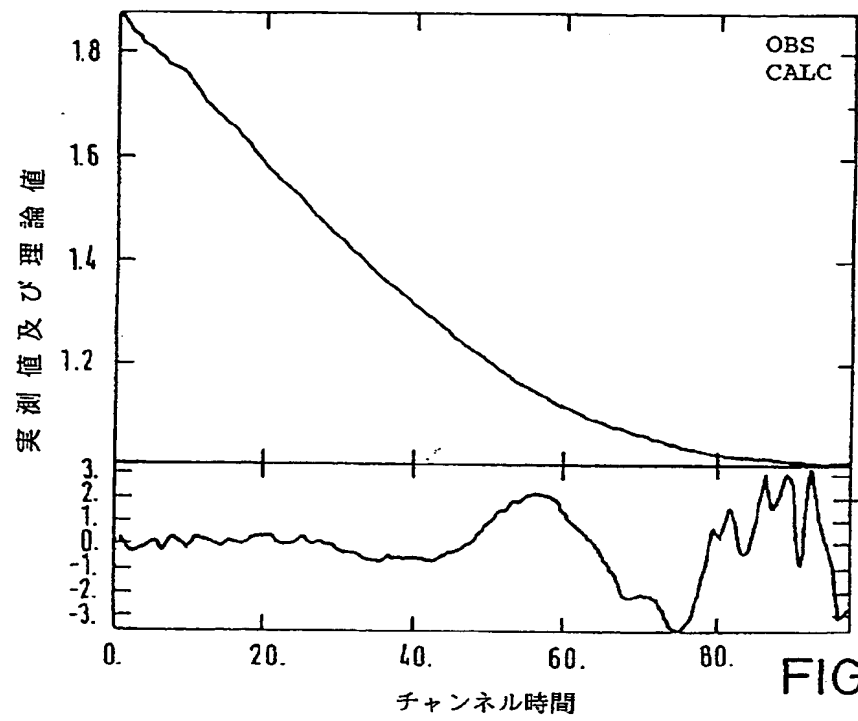


FIG.27

【図 28】

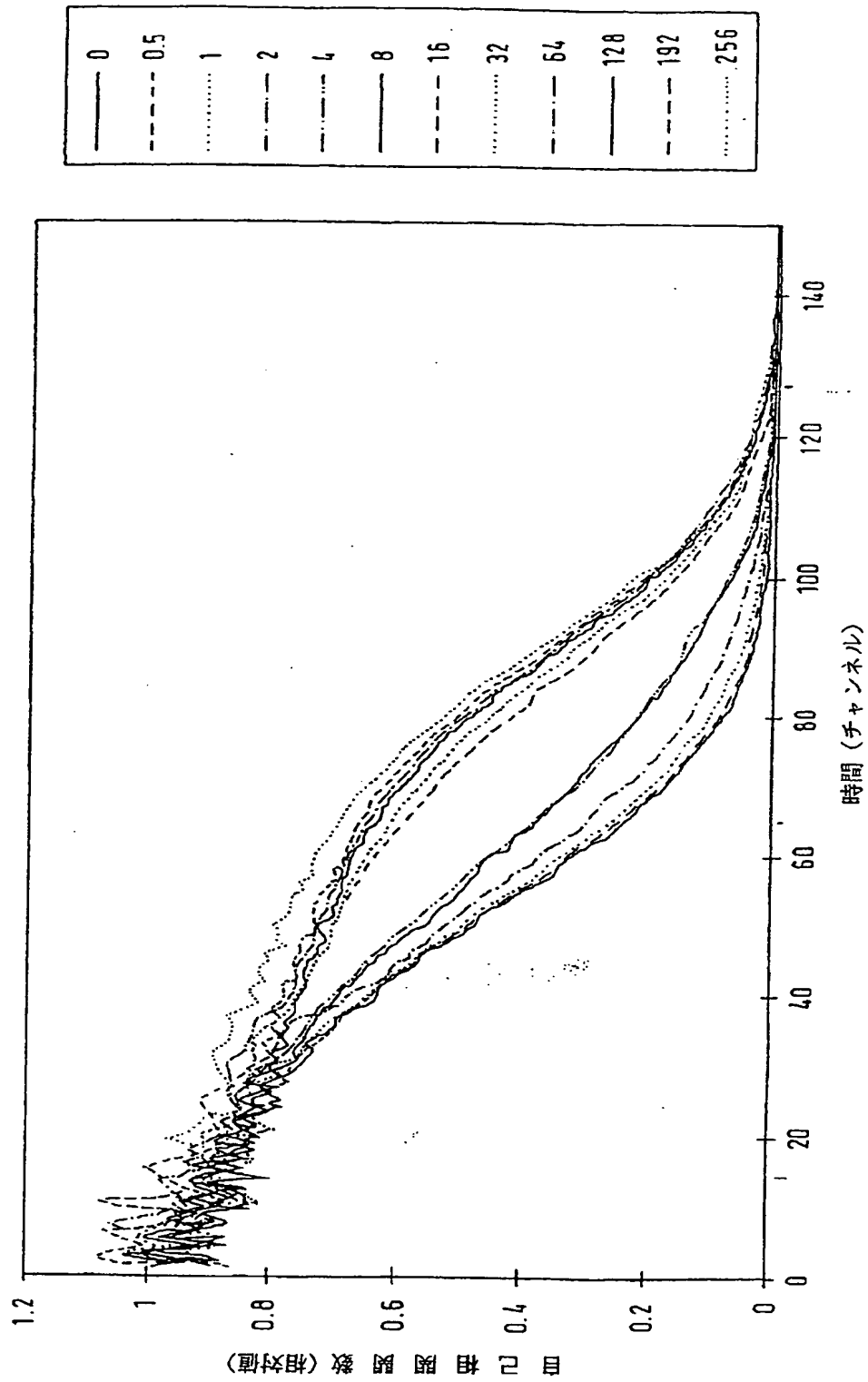


FIG.28a

【図28】

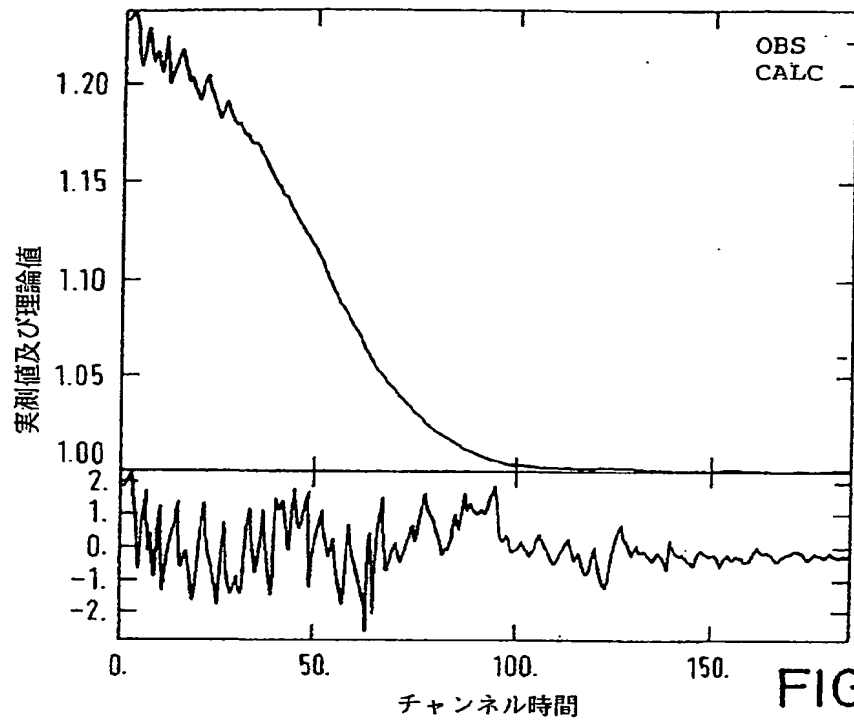


FIG.28b

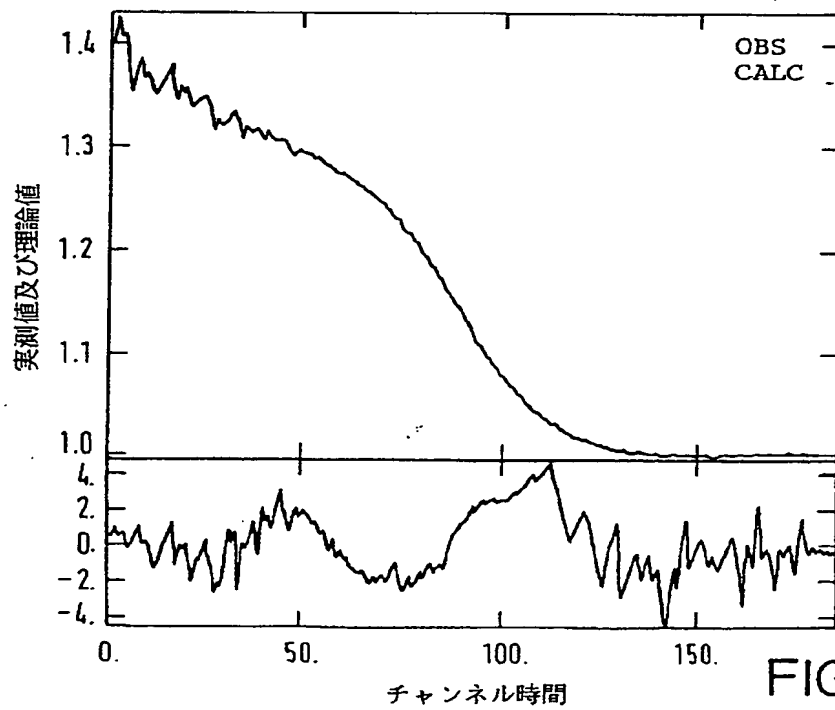


FIG.28c

【図29】

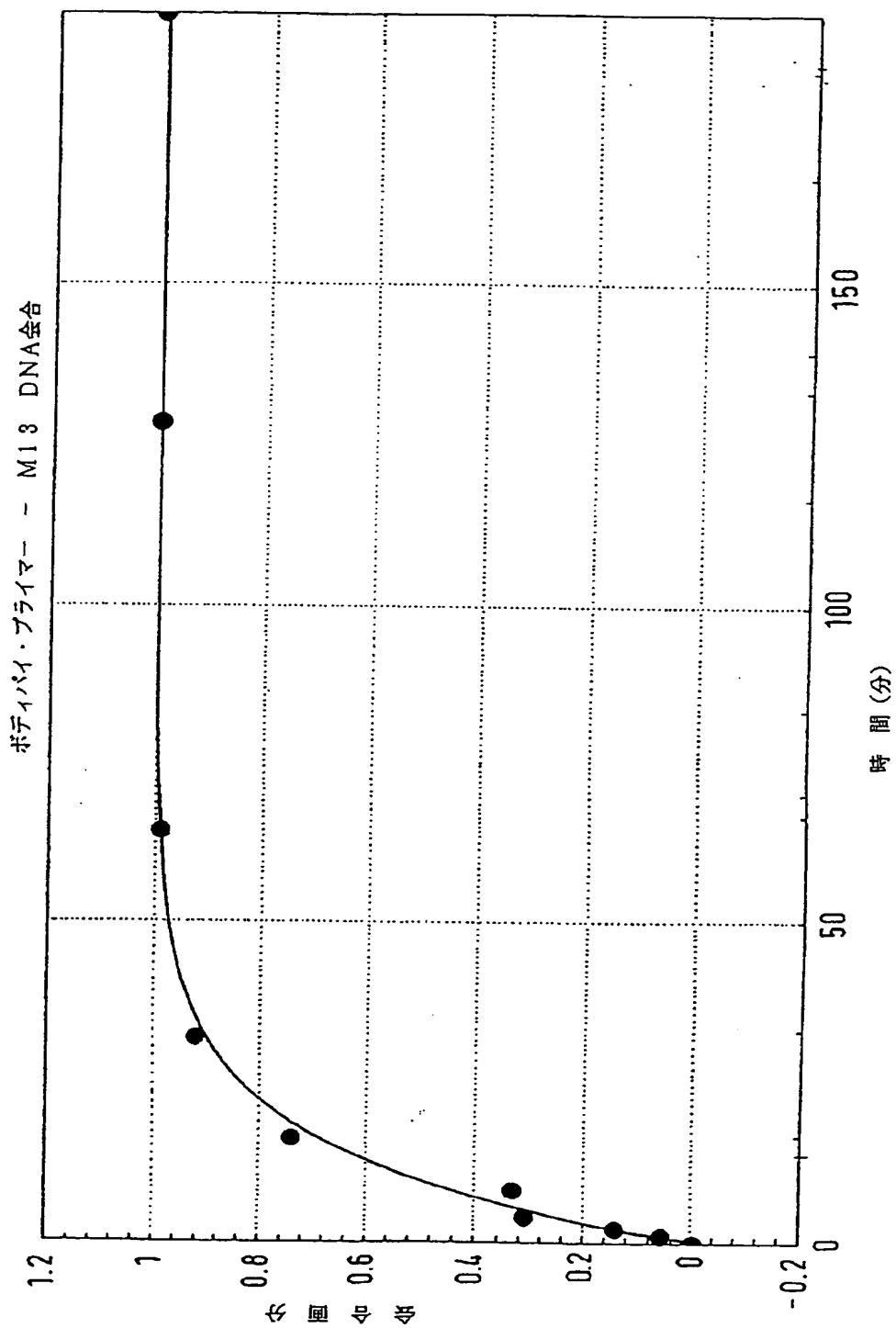


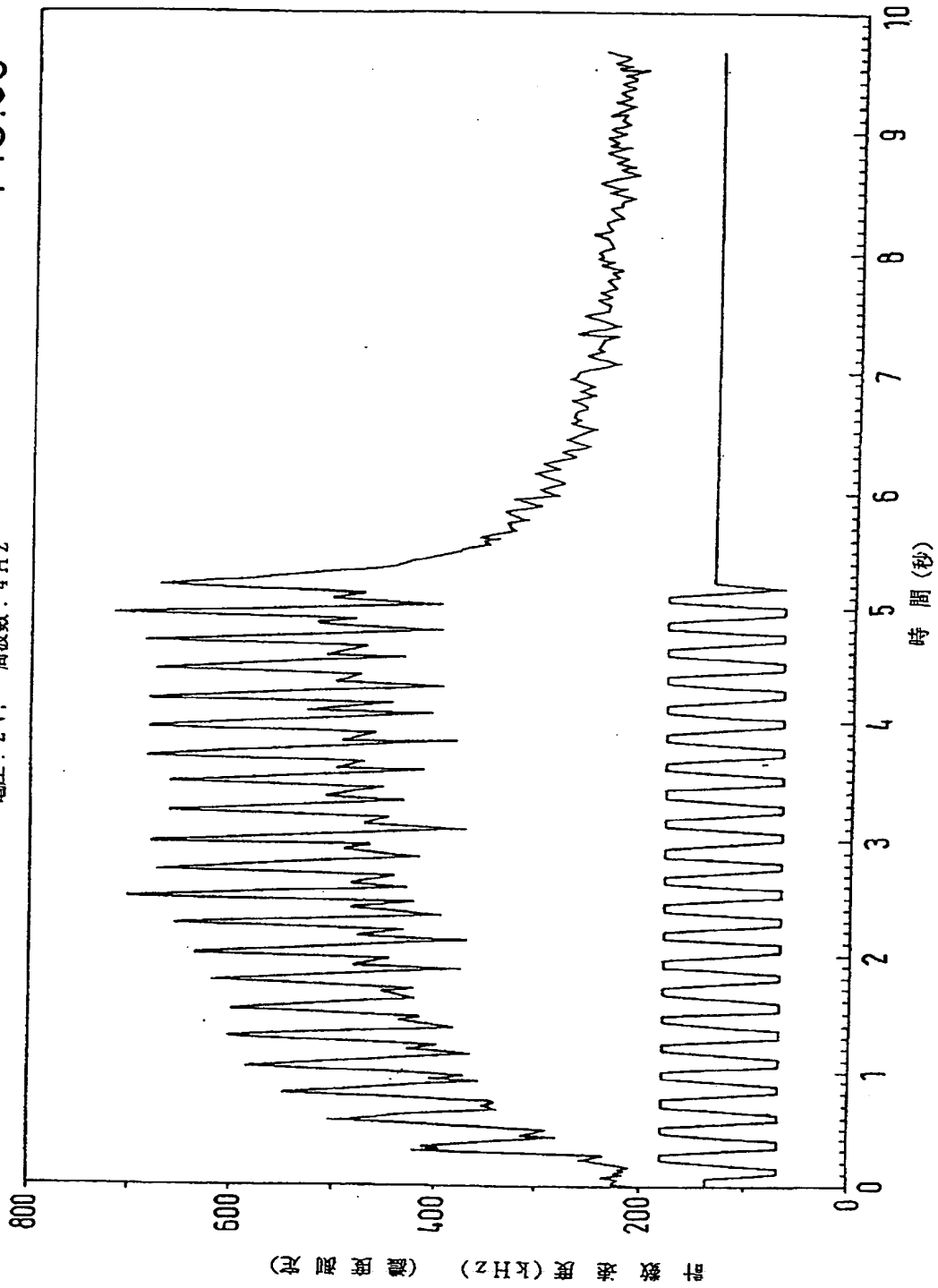
FIG.29

【図30】

RDV10. DAT (Rho-dUTP スチールチップを含む)

電圧: 2V, 周波数: 4Hz

FIG.30



【図31】

ローダミン6G (単一分子) のマルチチャンネル検出

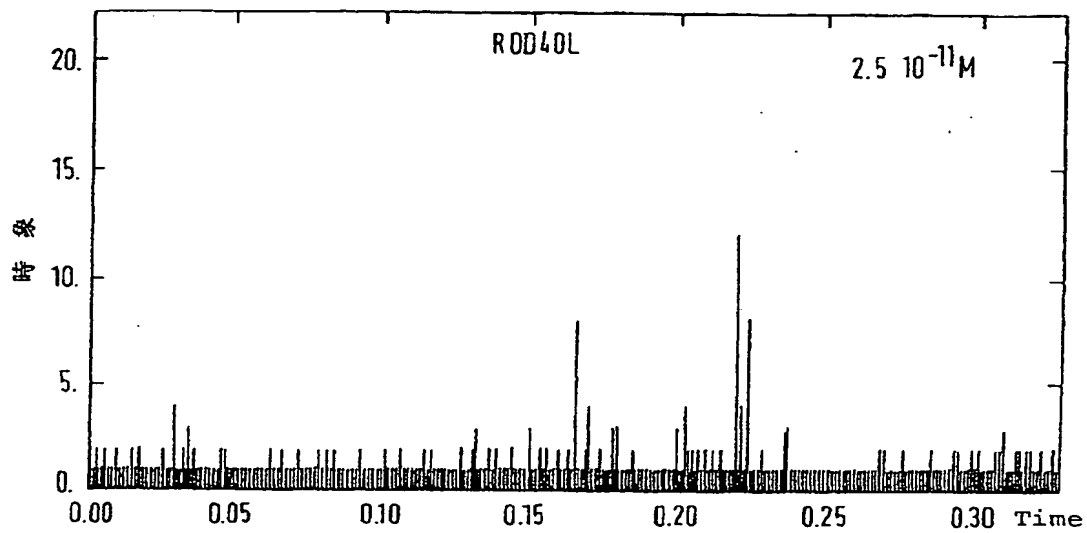


FIG.31a

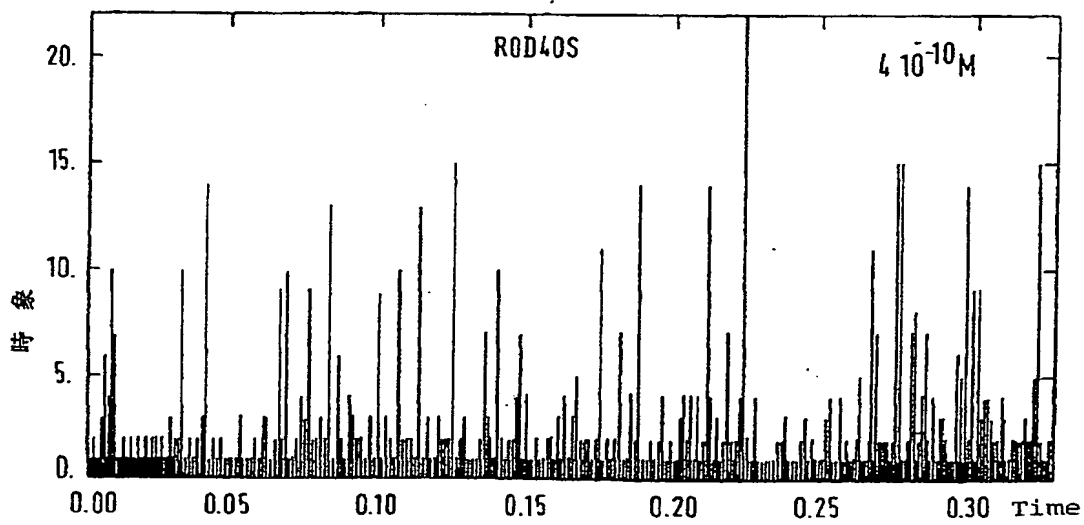


FIG.31b

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 5 G01N21/64		International Application No. PCT/EP 94/00117
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 G01N G01J G02B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOPHYSICAL JOURNAL, vol.43, no.1, July 1983 pages 103 - 114 N.L. THOMPSON ET AL 'Immunoglobulin surface-binding kinetics studied by total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy' see abstract see page 104, right column, line 27 - line 40 see page 105, right column, line 1 -- penultimate see page 106, left column, line 4 - line 9 see page 109, left column, penultimate line - right column, line 5 see figures	1,2,5-7, 71,73
A	--- -/--	47,56, 64,72, 75,77
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 August 1994		Date of mailing of the international search report 26.08.94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentstein 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 cpo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Thomas, R.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.
PCT/EP 94/00117

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol.610, 1980 pages 28 - 46 S.M. SORSCHER ET AL 'The use of fluorescence correlation spectroscopy to probe chromatin in the cell nucleus'	1,2,5-7
A	see page 28, paragraph 2 see page 29, paragraph 1 - paragraph 5 see page 30, line 3 - line 13 see page 32, line 21 - line 34 see page 33, line 25 - page 34, line 14 see page 41; figures 1,4	71,75,80
Y		1,2,5-7, 47-49, 51-53, 55-58,64
Y	--- EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL, vol.12, no.3, 1985 pages 163 - 166 P. KASK ET AL 'Fluorescence correlation spectroscopy in the nanosecond time range: photon antibinding in dye fluorescence' see abstract see page 163, right column, line 3 - line 7 see page 164, left column, line 26 - right column, line 41 see page 164, right column, line 20 - line 25 see page 165, right-column, last paragraph - page 166, left column, line 2 see figure 1	1,2,5-7, 47-49, 51-53, 55-58,64
A		71,79
X	--- FLUORESCENCE SPECTROSCOPY Herausgeber: O.S. WOLFBEIS, Springer-Verlag, 1992, Seiten 13-24 R. RIGLER et al.: 'Interactions and kinetics of single molecules as observed by fluorescence correlation spectroscopy' see page 13, paragraph 1 see page 13, penultimate line - page 14, line 17 see page 20, line 6 - line 10 see page 23, line 10 - line 21; figures 2.1,2.2	1,2,5-7, 71-73,80
A		47,48, 55,57
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internat. Application No.
 PCT/EP 94/00117

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SPRINGER SERIES IN OPTICAL SCIENCES, Band 38: 5. Int. Conf. Photon Correlation Techniques in Fluid Mechanics, Kiel-Damp, DE, 23-26 Mai 1982 P. KASK ET AL: 'Fluorescence correlation spectroscopy in solutions' see page 393, paragraph 2 see page 394, last paragraph - page 395, line 14 see page 396, paragraph 2 - page 397, line 1; figures 1,2 ---	1,2,5-7, 47-50,56
A	BIOPHYSICAL JOURNAL, vol.54, no.6, December 1988 pages 983 - 993 T. MEYER ET AL 'Particle counting by fluorescence correlation spectroscopy' see page 984, left-column, paragraph 'Lipid Vesicles' see page 987, right column, line 25 - line 35 see figure 2, inclusive signature ---	1-7,15, 33, 47-50,65
A	JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol.88, 1987 pages 145 - 149 R. WIEGAND ET AL 'Laser-induced fusion of mammalian cells and plant protoplasts' see page 145, right column see figure 1 ---	20,47, 57,60,64
A	EP,A,0 501 688 (HITACHI) 2 September 1992 see column 1, line 13 - line 43 ---	14,37,47
A	WO,A,92 01513 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 6 February 1992 cited in the application see page 18, line 14 - line 17 see page 35, line 16 - line 18; figure 2 ---	14-16, 37,47
A	BIOPHYSICAL JOURNAL, vol.51, no.2, February 1987 pages 339 - 343 A.G. PALMER III ET AL 'Theory of sample translation in fluorescence correlation spectroscopy' see page 339, right column, line 13 - line 28 see page 342, left column, line 5 - line 36 --- -/--	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.
PCT/EP 94/00117

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BIOPHYSICAL JOURNAL, vol.49, no.4, April 1986 pages 809 - 815 N.O. PETERSON ET AL 'Scanning fluorescence correlation spectroscopy' see abstract see page 811, left column, line 12 - line 28 see page 812, left column, line 28 - line 31</p> <p>---</p>	1,3
A	<p>PROCEEDINGS 46th ANNUAL MEETING ELECTRON MICROSCOPY SOCIETY OF AMERICA, MILWAUKEE, CA, 7-12 August 1988, Seiten 38-39 H. QIAN ET AL: 'Fluorescence microscopic analysis of molecular interactions in 3-dimensional samples by means of fluorescence correlation spectroscopy and photobleaching recovery' see page 38, paragraph 2 see page 39, last paragraph</p> <p>---</p>	1,36,39
A	<p>AIP CONFERENCE PROCEEDINGS, Nr. 258 48th INT. PHYSICAL CHEMISTRY MEETING: SYCHROTRON RADIATION AND DYNAMIC PHENOMENA, GRENOBLE, FR, 1991, pages 419-427 J. GOULON ET AL: 'X-ray excited fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for molecular dynamics studies' see abstract see page 425, line 1 - line 4</p> <p>---</p>	1
A	<p>BIOPHYSICAL JOURNAL, vol.41, no.2, February 1983 pages 119 - 133 O.S ANDERSEN 'Ion movement through gramicidin A channels. Single-channel measurements at very high potentials' see abstract see page 120, left column, penultimate line - page 123, left column, line 14. see figure 1</p> <p>---</p>	11,61
A	<p>EP,A,0 245 206 (BATTELLE) 11 November 1987</p> <p>see abstract see page 1, line 1 - page 5, line 11</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1,17,18, 23,42-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internat. Application No.
 PCT/EP 94/00117

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	<p>APPLIED OPTICS, vol.32, no.6, 20 February 1993, NEW YORK US pages 794 - 805 A.P. LARSON ET AL 'Semiconductor laser-induced fluorescence detection in picoliter volume flow cells' see abstract see page 794, left column, line 1 - right column, line 15</p> <p>---</p>	1,11,21, 61
A	<p>US,A,4 405 237 (MANUCCIA) 20 September 1983 see column 3, line 16 - line 25 see column 4, line 5 - line 10; figure</p> <p>---</p>	81
X	<p>EP,A,0 319 815 (MOLECULAR THERAPEUTICS) 14 June 1989 see abstract</p> <p>see column 7, line 14 - line 20 see column 11, line 21 - line 36 see column 12, line 45 - line 54 see column 19, line 21 - line 26 see examples 1-3</p> <p>---</p>	66-68
X	<p>MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol.36, no.5, 1992 pages 479 - 494 S. HARADA ET AL 'Induced CD25 expression in a human B-lymphoma cell line transfected with the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 gene' see abstract see page 482, line 6 - line 20 see page 482, last paragraph see page 486, line 6 - line 7 see figure 5; tables 1,2</p> <p>---</p>	66-68
X	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol.267, no.6, 25 February 1992 pages 4084 - 4096 R.D. TEASDALE ET AL 'The signal for Golgi retention of bovine beta-1,4-galactosyltransferase Is in the transmembrane domain' see abstract see page 4088, left column, line 33 - line 56 see page 4091, right column, line 6 - line 29 see figure 5F</p> <p>---</p>	66-68

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 94/00117

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol.64, no.6, June 1990 pages 2788 - 2795 A. YASUDA ET AL 'Induction of protective immunity in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses ...' see abstract see page 2789, right column, line 12 - line 24 see page 2790, right column, line 14 - line 25 see figure 3</p> <p>---</p>	66-68
X	<p>EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol.22, no.11, 1992 pages 2777 - 2781 O.T. KEPLER ET AL 'Human Golgi beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase generates a group of sialylated B lymphocyte differentiation antigens' see abstract see page 2779, left column, line 1 - right column, line 6; figure 2</p> <p>---</p>	66-68
X	<p>MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol.5, no.11, 1991 pages 1696 - 1706 E.J. PLATT ET AL 'Altered effects of glucocorticoids on the trafficking and processing of mouse mammary tumor virus glycoproteins ...' see abstract see page 1697, right column, penultimate line - page 1698, left column, line 14; figure 2</p> <p>---</p>	66
X	<p>VIROLOGY, vol.178, no.1, 1990 pages 263 - 272 V. LITWIN ET AL 'Cell surface expression of the varicella-zoster virus glycoproteins and Fc receptor' see abstract see page 265, left column, last paragraph - page 266, left column, line 47; figures 1,2</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 94/00117

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol.108, no.2, February 1989 pages 339 - 353 J. HEARING ET AL 'Isolation of Chinese hamster ovary cell lines temperature conditional for the cell-surface expression of integral membrane glycoproteins' see abstract see page 340, right column, line 18 - line 44 see page 341, right column, line 26 - page 342, left column, line 22 see figures 1,2</p> <p>---</p>	66
X	<p>BLOOD, vol.69, no.3, March 1987 pages 886 - 892 R.A.ASHMUN ET AL 'Expression of the human monocyte membrane antigen gp55 by murine fibroblasts after DNA-mediated gene transfer' see abstract see page 887, right column, line 17 - line 44 see page 888, left column, line 11 - line 53; figures 1,2</p> <p>---</p>	66
P,X	<p>US,A,5 223 408 (GOEDEL) 29 June 1993 see column 1, line 21 - line 25 see column 5, line 29 - column 6, line 8</p> <p>-----</p>	66-68

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 94/00117

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. Claims : 1-65, 69-84
2. Claims : 66-68

For further information, please see Form PCT/ISA/206 from 13.05.94.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☒

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 94/00117

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0501688	02-09-92	JP-A- 5210052 US-A- 5296963	20-08-93 22-03-94
WO-A-9201513	06-02-92	DE-A- 4022792 EP-A- 0539369 JP-T- 6500727	06-02-92 05-05-93 27-01-94
EP-A-0245206	11-11-87	AU-A- 7583887 WO-A- 8706956 JP-T- 1500221	01-12-87 19-11-87 26-01-89
US-A-4405237	20-09-83	NONE	
EP-A-0319815	14-06-89	AU-A- 2659488 JP-A- 2042977	08-06-89 13-02-90
US-A-5223408	29-06-93	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
G 0 1 N 33/543	5 9 5	G 0 1 N 33/58	A
33/58		27/26	3 2 5 A

(31)優先権主張番号 P 4 3 4 2 7 0 3 . 0

(32)優先日 1993年12月15日

(33)優先権主張国 ドイツ (DE)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, L K, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, UZ, VN

(72)発明者 アイゲン・マンフレッド
ドイツ連邦共和国、ゲッティンゲン D—
37075、ゲオルグ・デヒオーベーク 14

(72)発明者 ヘンコ・カルステン
ドイツ連邦共和国、エルクラス D—
40699、キルヒベルク 4

(72)発明者 ウロ・メッツ
エストニア、タリン E E—0013、テドレ
24

(72)発明者 イェルカー・ヒデングレン
スウェーデン、ソルナ S—17132、スヨ
ベゲン 2

(72)発明者 ミハエル・シュトゥッケ
ドイツ連邦共和国、ゲッティンゲン D—
37077、アウフ・デル・リース 36

(72)発明者 ミハエル・ブリンクマイヤー
ドイツ連邦共和国、ゲッティンゲン D—
37077、ハノーファーシェ・シュトラッセ
134

(72)発明者 ウォルフガング・ジム
ドイツ連邦共和国、ロスドルフ D—
37124、シュタイン・フルルベーク 2ベ
ー

(72)発明者 オラフ・レーマン
ドイツ連邦共和国、ゲッティンゲン D—
37077、シーエ・シュトラッセ 19

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第6部門第1区分
 【発行日】平成11年(1999)11月9日

【公表番号】特表平11-502608
 【公表日】平成11年(1999)3月2日
 【年通号数】
 【出願番号】特願平6-515700
 【国際特許分類第6版】
 G01N 21/64

27/447
 30/74
 33/483
 33/543 595
 33/58

【F I】

G01N 21/64 B
 Z
 30/74 Z
 33/483 C
 33/543 595
 33/58 A
 27/26 325 A

手続補正書

平成11年6月9日



特許庁長官殿

1. 事件の表示

PCT/EP94/00117
 平成6年特許願第615700号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名(名称) ニボテック バイオシステムズ
 アクティン グゼルシャフト

3. 代理人

住 所 〒104-0031 東京都中央区東橋1丁目5番5号
 KRFビル5階
 電話 03-3271-1331

氏名 (9263) 赤堀三 敏彦 等

4. 補正命令の日付 日付

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」及び「特許請求の範囲」の欄

6. 補正の内容

- (1) 特許請求の範囲を原紙の如く補正する。
 (2) 明細書の下記の箇所を下記の如く補正する。

補正箇所	補正前	補正後
15頁3行	平行した検出	垂直した検出
17頁22行	レンズのほうに	レンズの方に
19頁25行	スチロイドホルモン	ステロイドホルモン
25頁17行	ラジオアイソトープの感度	ラジオアイソトープ法の感度
26頁10行	色覚認識の消光減少	色覚認識の消光現象
26頁20行	測定容積の	測定容積の
30頁18行	電気的分子トラップ	電気的分子トラップ
31頁4行	対物レンズで	対物レンズから
36頁1行	分析する(E)	分析するの
36頁21行	金属被覆ガラス	金属被覆ガラス
41頁19行	分子は液体	分母は液体
43頁20行	拡張されか	拡張されかつ
43頁22～23行	分析において	分析において
45頁6行	分析法を用いる	分析法を用いる
51頁下から4行	フォリグイオード	フォトダイオード
53頁1行	ビーム経路	ビーム経路から
53頁4行	単独プレート	単独プレート64
53頁9行	支持アーム	支持アーム56
53頁24行	レンズ78等	レンズ78等
53頁28行	標準台	標準台79

5.4頁下から 5行	レーザー光	レーザー光70、71
5.5頁1～2行	測定部分へのレンズ位置	測定部分62へのレンズ 位置
5.5頁5行	スプリッター	スプリッター60
5.8頁下から9 行	電極)：六	電極)：e、fは六
5.8頁下から2 行	または	または

(別紙)

特許請求の範囲

1. 測定時間500ns以下で、かつ分析する分子の励起経路が
おいてレーザー励起光と励起励磁(以下FCS)を用いた、1
μm以下の濃度に変化した1つまたは多数の分子を測定する
方法であつて、前記レーザー励起FCSを用いた測定が、少な
くとも1つの10⁻¹⁴ワット以下のおよび小さな容積ユニットま
たは多数の観望ユニットにおいて、測定されるとき分子の
発光強度によって決定される物質特異的パラメータを決定す
ることによって行われる方法、
2. 前記物質特異的パラメータとして、前記励起経路、励起
励磁係数、励起および発光強度、発光励磁の各励起励磁の
割合、またはこれらの測定量の組み合わせを決定する請求項
1に記載の方法、
3. 通常のまたは非常にゆっくりした励起する発光複合体を分析
するために、測定容積におよび試料容積を動かすこと、および
または経時的にレーザービーム光の位置および/または検
出光学的焦点の位置を変化させることにより、測定容積の
時間経路を分析中に試料容積の空間座標に対して動かさせる、
但し、測定した並進励磁係数が実質的な励起励磁係数と測定
部分の位置の上に置かれた物理的性質の変化との組み合わせに
対応している、ことを特徴とする請求項1または2に記載の
方法、
4. 前記測定部分の座標の経時変化が、通常のまたは非常に
ゆっくりした励起する発光複合体の足かけの励起時間を決定す
ることを特徴とする請求項3に記載の方法、
5. 励起光の発光が制御されるべき分子と直接相互作用し、

励起励磁が測定されるべき分子のタイプまたは濃度と相関す
る分光学的パラメータを有する発光リガンドまたはリガンド
複合体である、ことを特徴とする請求項1乃至6のいずれ
か1項に記載の方法、

6. 相同の励起による並進励起および/または励起励磁の測
定を用いた励起経路の評価が、存在する分子の絶対数および/
またはその経時変化の測定により、および/または経時的に
異なるリガンドおよび/またはリガンド複合体の発光の濃度
の測定により、かつそれらから誘導される特異的相互作用の
熱力学的結合定数および/またはリガンド結合分子に関する
特異的励起反応または解離経路の速度定数を用いて行われる
請求項1乃至6のいずれか1項に記載の方法、
7. 前記測定分子または分子複合体がイオン性または非イ
オン性である請求項1乃至6のいずれか1項に記載の方法、
8. 前記測定が時間に対して一定または変化するスーパーイ
ンポーズされた
(superimposed)電場または磁場中で行われることを特徴と
する請求項1乃至6のいずれか1項に記載の方法、
9. 試料容積のイオン性分子または分子複合体が励起エレ
メントを通過すること、または励起時間、測定エレメントに留
まることを監視した励起または励起励磁で励起する請求項9
に記載の方法、
10. 電光的分光グラフを使用する場合、励起したリガンド
が複合体を作るターゲット分子よりも小さい荷電を有するか、
またはターゲット分子の測定と励起励磁を有することを特徴
とする請求項8または9に記載の方法、
11. 前記分析が励起した色発光励磁リガンド、特に励起プロ

ブを特に複合化したリガンド、特に励起ハイブリッドから
分離するための電光励起励磁法と組み合わせられ、かつ多数に
励起励磁色を有するリガンドを使用することが望ましい、
ことを特徴とする請求項1乃至10のいずれか1項に記載の
方法、

12. 検出すべき励起励磁テスト試料および分析物の複合体および
励起励磁の分析物を第1の電光励起励磁ステップで予備励起し、かつ
検出すべき複合体を第2の電光励起励磁ステップで測定容積エレ
メントに輸送することを特徴とする請求項1乃至11のい
ずれか1項に記載の方法、
13. 発光性リガンドおよび/または発光性リガンド複合体が
励起効率0.1以上で30,000以上の低光効率を有すること、
および/または効果的測定時間を短縮するために発光リガ
ンドとして1つ以上の色素オリゴマーを使用することを特徴と
する請求項1乃至12のいずれか1項に記載の方法、
14. 前記測定部分がニーマージェンス対物レンズから1000μm
以下の距離距離に励起され、該対物レンズは直接試料容積に
接しているか、または試料容積が透明シートでニーマー
ジェンス・レンズから分離されていることを特徴とする請求項1
乃至13のいずれか1項に記載の方法、
15. 前記測定された分子および/または分子の平衡複合物お
よび/または励起励磁反応過程は少なくとも1つの試料容積エレ
メントで分析され、複数の試料容積エレメントの場合、該レ
ジメントが二次元配列の二次元オリゴマー上、特にメソプレ
ンまたはシートおよび/またはフエバ素面に、または線状に
配列したオリゴマー中で配列し、または試料容積が
励起励磁内で励起した、または天然の励起励磁または励起励磁、お

- およびまたは人工的に調整したベシカル構造、特にリポソームまたはベシカル形成性有する可溶性ポリマーに基づくベシクル中に存在することを特徴とする請求項1乃至16のいずれか1項に記載の方法。
15. 前記各試料容器がマイクロディスペンシング・システムを用いて生成することを特徴とする請求項1乃至16のいずれか1項に記載の方法。
17. 前記各試料に対して選択したDNA又はRNAレベルの遺伝子型への検定は、各遺伝子エレメントの局所的な位置をマークすること、望ましくは光学的マーキング用の光化学的に活性化可能な物質を用いた変異型分析に使用されるシーザーシステムを用いること、または可溶性または表面結合型の選択された変異エレメントの内部物と検定し、特にソラレン誘導体により、および結合した誘導エレメント、特にオリゴヌクレオチドまたはピオチンまたはアビジンまたはストレプトアビジンまたはポリビベンチドまたは多環化試薬またはこれらの組み合わせ物に結合した活性化可能な物質への特異的結合により選択された遺伝子型の前述エレメントと変異な化学的相互作用を行いうる光化学的活性化可能な試薬による選択された遺伝子型の高次の分離を可能にすることにより対応する測定位置の光化学的標識が可能となることを特徴とする請求項1乃至16のいずれか1項に記載の方法。
18. スクリーニング操作において、薬学的に活性のある物質を、セプターに対する発光性リガンドの結合で検出する作用を決定する事による特異的セプターとの相互作用により分析し、そのキャリアー細胞上の天然のセプター、ならびにセプターを過剰発現するキャリアー細胞上のセプター、

または発現された分子または分子複合体の形のセプターを使用することを特徴とする請求項1乃至17のいずれか1項に記載の方法。

19. 現在に在る活性物質と特異的セプターおよび特に選択された生理学的リガンドとの相互作用の分析において、異なる結合能が変異体と標識された天然のリガンドとの結合を相当する事で測定される少なくとも2つのセプターが使用されることを特徴とする請求項1乃至18のいずれか1項に記載の方法。
20. 試料容器内で特異的セプターまたは細胞の細胞内物質と現在に在る活性物質との相互作用の分析において、細胞の主要な成分が分離可能か、または代謝的に活性を維持していることを特徴とする請求項1乃至19のいずれか1項に記載の方法。
21. 特異的認識反応の検出に関して、現在に在る物質が複雑な天然、合成または半合成複合物中に存在し、かつ、該複合物が分析前にクロマトグラフィーで分離される、但し、望ましくは特異的認識反応で結合する特異化リガンドをクロマトグラフィー分離後に分離されたフラクションに添加し、かつ引き続いて競争反応をターゲット分子との特異的相互作用で分析する、ことを特徴とする請求項1乃至20のいずれか1項に記載の方法。
22. 前記クロマトグラフィーユニットの代わりに、試料ディスペンジョン・ユニットを使用することを特徴とする請求項1乃至21のいずれか1項に記載の方法。
23. 試料室中の相同的な相結合的核酸分子のタグおよび/または標識をハイブリダイゼーションにより、少なくとも1つ
- の標識した誘導プローブを用いて分析する、但し、望ましくはプローブ結合色素標識がプローブの二次構造と相互作用しないか、または望ましくは特異的相互作用が可能であり、かつ、特に変異型シアゾール・オレンジ色素を用いることで分光学的発光信号を強化させる、ことを特徴とする請求項1乃至22のいずれか1項に記載の方法。
24. 核酸標識を目的とした前記プローブとしては、望ましくは合成または細胞超性RNAまたはDNA型の特定の領域を有する（または一編）池刺成分としての一本鎖核酸を使用することを特徴とする請求項23に記載の方法。
25. ハイブリダイゼーションにおける複合体形成の反応速度がカオトロピック極および/または有極極、特にジェノールを含む媒体中で検定を行うことで促進されることを特徴とする請求項23または24に記載の方法。
26. ハイブリダイズした核酸の相溶性の程度を複合体の熱力学的安定性を介して分析することを特徴とする請求項23乃至26のいずれか1項に記載の方法。
27. 相結合的核酸の検出が内部標準を用いて定量化され、該内部標準が少なくとも1つの点突然変異で定量化される核酸の配列と区別され、かつ該分析が内部標準とプローブの複合体および分析する核酸分子とプローブの複合体の種々の構造が色素分子の蛍光強度および/または同位体数に備して区別される形で行われることを特徴とする請求項23乃至26のいずれか1項に記載の方法。
28. 色素標識リガンドとの複合体形成の感度が、有効反応係数を減少する、および/または反応物間の水和能を変化させる、および/または特にポリマーおよび/またはオリゴマ
- ー、望ましくはポリエチレングリコール類、デキストラン類、タンパク質類、ポリビニルピロリドン類、カオトロピック試薬類、有機溶媒などを使用することにより相分離により反応物の有効濃度を増大する、特異的認識を反応媒体に添加することにより有効濃度を増加することで増進されることを特徴とする請求項1乃至27のいずれか1項に記載の方法。
29. 検出されるべき複合体を、望ましくはテスト試薬および検出されるべき分析物との複合体の間のサイズおよび/または染料の蛍光増大する目的で過剰量添加される少なくとも1つの付加リガンドと反応させることを特徴とする請求項1乃至28のいずれか1項に記載の方法。
30. 検出反応の特異性を、望ましくは反応物に対し過剰となるテスト試薬の組み合わせ物との少なくとも三点複合体を形成させることで増進し、蛍光検出される色素が少なくともセノマーとして結合する別のテスト試薬の発光色素の励起に適合する発光増大を有する少なくとも1つの色素リガンドで少なくとも1つのテスト試薬が標識されていることを特徴とする請求項1乃至29のいずれか1項に記載の方法。
31. 少なくとも2つの分析物が、少なくとも2つの発光色素で標識され、かつ、異なる波長の光で励起されるか、または異なる発光波長の光で励起して検出される2つの異なるテスト試薬の反応により、1回の検定の1つの試料で一挙に分析されることを特徴とする請求項1乃至30のいずれか1項に記載の方法。
32. 特定の分析物が、各々少なくとも2つの光学的に異なる蛍光分子で標識された少なくとも2つのテスト試薬と同時に複合体を形成し、該同時複合体形成がエネルギー転移複合体

- の形成および/または異なる励起および/または発光強度を有するシグナルの時間相関によって検出されることを特徴とする請求項1乃至31のいずれか1項に記載の方法。
33. 試料をベシクル構造の配合物、特に脂質膜有ベシクル、特に VLDL、LDL および/または HDL 型のベシクルに関して、該ベシクルを蛍光標識抗体で染色することおよび/または全脂質分子を特異的および持続的にベシクル構造に取り込むことにより分析することとを特徴とする請求項1乃至32のいずれか1項に記載の方法。
34. 試験管内タンパク質合成産物の産物、特異的結合性または膜透過性に関して分析することとを特徴とする請求項1乃至33のいずれか1項に記載の方法。
35. オリゴマーまたはポリマー、分布物平均並進拡散係数および/または平均回転拡散係数およびそれぞれの分布の平均値に関して分析されることを特徴とする請求項1乃至34のいずれか1項に記載の方法。
36. 望ましくは固定化細胞または細胞配合物、組織、オルガネラ、細胞構造物およびその他の三次元的に仕切られた試料容器および固定化構造をもつ試料容器において、いくつかの造影エレメントが特定の分子のジノナミクスまたは反応速度に関してカバーされており、該造影エレメントの位置座標も同時に考慮され、かつ、該造影エレメントが二次的または三次元的線に組み合わされることを特徴とする請求項1乃至35のいずれか1項に記載の方法。
37. レセプター分子と試料中に存在するリガンドの間の複合体形成が溶液中の色素標識リガンドの競争、または固相結合分子の両方、または細胞膜成分の両方により分析され、

かつ、生物学的試料がシート状で提供されることで分析されるべき固定部分が1000 μm 以下の望ましい距離で分析されることを特徴とする請求項1乃至36のいずれか1項に記載の方法。

38. 蛍光の細胞内解消の検出を目的とした検定法として開発されたキット・システムを使用する請求項1乃至37のいずれか1項に記載の方法。
39. 望ましくは固定化細胞または細胞配合物、組織、オルガネラ、細胞構造物を含む三次元的構造を有する試料容器中におけるダイナミック・プロセスまたは反応速度プロセスの二次元的または二次元的結合を目的として使用される請求項36に記載の方法。
40. 表面固定細胞、特に染色体、転写複合体、複製複合体、または細胞または組織構造体などの高分子複合体の、望ましくは少なくとも二つの本発明に従って標識したリガンドの使用による特定のターゲット分子の可視化および/または参照位置に対する空間的相関によるインセイチュア分析を目的として使用される請求項1乃至39のいずれか1項に記載の方法。
41. 評価すべき造影エレメントを反応条件に同時にまたは連続的に与え、かつ、限定した反応時間、反応速度の分析を行うことによる特異的物質の転移または色素リガンド結合分子の結合反応の反応速度の測定を目的として使用される請求項1乃至38のいずれか1項に記載の方法。
42. 特定の分子および/または分子複合体および/または分子および/または分子複合体の分子振動を定性的および/または定量的にカバーすること、特に生学的に活性なセンサー

ー、特に表面レセプターの測定および/または評価またはレセプター結合リガンド又はリガンド複合体の評価等を目的として使用される請求項1乃至38のいずれか1項に記載の方法。

43. 発光面保有リガンドと標識分子のレセプター分子への結合的結合を促進することによるラジオイムノアッセイまたは酵素結合イムノアッセイの代替法として使用される請求項1乃至38のいずれか1項に記載の方法。
44. 複製分子、特に複製またはそれらに由来するタンパク質またはペプチド、複製な化学反応産物、化学反応で生成された産物の複製なシステム、または細胞合成産物などの、次代謝物の複製な配合物のような複製な分子配合物を分析することを目的として使用される請求項1乃至38のいずれか1項に記載の方法。
45. 複製な複製配合物の分析を分析的分画を含めてオンラインで行うために使用される請求項1乃至38のいずれか1項に記載の方法。
46. 分子、分子複合体または細胞、特に精子、卵母、細胞性エレメント、胚生または細胞膜成分および膜タンパク質の移動度の測定を目的として使用される請求項1乃至38のいずれか1項に記載の方法。
47. 非常に希釈した溶液の小さな測定部分における蛍光の励起のためのレーザーフォークスティング、および/または測定のための発光した蛍光の非線形的検出として知られている順次励起法を含み、望ましくは全FRET、の両方複数の光学システムを少なくとも一つ使用し、望ましくは解像度の対物レンズの後ろにある検出板にある非線形的に配置したピンホール面

口で制限されており、および/または配光部分に望ましくは検出用対物レンズから1000 μm 以下の距離に位置する請求項1乃至38のいずれか1項に記載の方法を光増強するための装置。

48. 初期シグナルの生成に、レーザー光(21)をプレ・フォーカシングするための装置(20)、該レーザー光(21)を屈折させるための二色性ミラー(30)、および測定領域にレーザー光をフォーカスするための付加的なレンズ(40)が提供され、かつ、屈折ユニットが光子計数装置(52)、相関装置(71)、およびマルチチャンネル・スケラー装置(72)を有し、かつ場合によっては測定シグナルがコンピュータで処理および/または評価される、測定シグナルを生成するユニットおよび検出ユニットを含むレーザー光の屈折制御フォーカシングを行うための請求項47に記載の装置。
49. プレ・フォーカシングのための装置(20)に順次励起光学系に相当するレンズ(22)およびアレイ(23)が提供され、光軸を合わせたレーザー光(21)がレンズLにより縮小後B、上および/またはアレイ(23)により縮小後B(第1像)上にフォーカスされる請求項48に記載の装置。
50. 前記アレイ(23)がプレ・フォーカスしたレーザー光(21)の強度を変化させるための交換可能なレンズが提供される請求項49に記載の装置。
51. 検出ユニットが、検出器から検出器(53,54)に送られる光(55)を分離するビーム・スプリッター(60)を有する2つの検出器(53,54)によって構成される請求項48乃至50のいずれか1項に記載の装置。
52. 発生した光(55)が検出器(53,54)の前に検出レンズ

- (50, 57) およびフィルター・エレメント (58, 59) を通過する請求項 51 に記載の装置。
53. 検出器 (53, 61) が異なる波長の光を検出する請求項 48 乃至 52 のいずれか 1 項に記載の装置。
54. 1 つ以上の検出器エレメントが、着目によって検出器アレイの形で正確に配置される請求項 48 乃至 53 のいずれか 1 項に記載の装置。
55. ビンホール開口 (50) が光路 (53) に配置される請求項 48 乃至 54 のいずれか 1 項に記載の装置。
56. 90° を超える角度をとるような 2 つの対称レンズを使用することを特徴とする請求項 47 乃至 55 のいずれか 1 項に記載の装置。
57. 発光波長 $> 200 \text{ nm}$ の波長を有する連続レーザー、特にアルゴン、クリプトン、ヘリウム・ネオン、ヘリウム・カドミウムレーザーまたは出力 0.5 mW 以上で 20 MHz 以上の高周波数を有するパルスレーザーを光源として使用する、とを特徴とする請求項 47 乃至 56 のいずれか 1 項に記載の装置。
58. 発光を放出するためになだれ型ダイオード放出器などの単一光子計数器を目的とした装置が発光経路中、望ましくはピンホール開口の直前に配置され、かつ、シグナル分析をデジタル検出器またはマルチチャネルカウンタで行うことを特徴とする請求項 47 乃至 57 のいずれか 1 項に記載の装置。
59. 測定部分が 2 つのキャピラリー間の試料容器内に固定され、該キャピラリーは外側に化学的に不活性な導電性コーティング、特に金属蒸着コーティング、特にクロム・プラチニングの金属コーティングが施され、新設の電位コーティングはコンピュータ・コントロールされる整流 (rectified) の

電場または交流電場に接続され、さらに測定部分を通して互いに電気的に連結されていることを特徴とする請求項 47 乃至 58 のいずれか 1 項に記載の装置。

60. 互いに向き合う 2 つの誘電体光学素子が測定部分を囲んでいることを特徴とする請求項 47 乃至 59 のいずれか 1 項に記載の装置。
61. 分析する試料および/または洗浄液のチャージ/ディスチャージを目的とした少なくとも 1 つの口を有する少なくとも 1 つの電気移動セル、望ましくはリング電極、ネバー (Nerve) キャピラリー、キャピラリー末端部の電極および液流出口を有する電気移動の追加的な装置が提供されることを特徴とする請求項 47 乃至 60 のいずれか 1 項に記載の装置。
62. 少なくとも 4 個の電極、望ましくはピン電極または望ましくは $< 1 \text{ nm}$ の穴が排列しているウェハ構造の電極電極を有するナノ電子エレメントを有する電気トラップであって、望ましくは少なくとも 6 個の電極の少なくとも 2 つの追加的電極と組み合わせ、各電子エレメントには交流 (alternating) 電圧が印加もしくは提供され、かつ、六極子電極には直流 (direct) 電圧をかけて、その結果、その特性が分析する分子の荷電と反対となる電気トラップを特徴とする請求項 61 に記載の装置。
63. 試料を捕捉することを目的としたシートは、特にイオン交換リガンドまたはアミノフェニルリガンド、特にオリゴベンゼン、ポリペプチド、タンパク質、液体または希薄試料、特にモノ二糖類またはニトリル三糖類リガンドの形で分子誘導体化による分子に対する特異的結合性を有しており、特にシートが特異的座位においてリガンドとして異なる結合

特性の異なる分子構造を有していることを特徴とする請求項 61 および 62 のいずれか 1 項に記載の装置。

64. 試料容器が二次元または三次元的にコントロール可能な試料受容装置に固定されており、のぞき口は試料が次元元的または二次元的ビエゾ素子を用いて測定光学系に対して照らすと空間座標に固定しうることを特徴とする請求項 61 乃至 63 のいずれか 1 項に記載の装置。
65. 測定装置が固定された座標においてレーザ光を屈折し、および/または検出位置を明確に決定しうる装置を有することを特徴とする請求項 61 乃至 64 のいずれか 1 項に記載の装置。
66. 単一微生物、特に細菌、懸濁細胞またはウイルスを検出および/または測定する方法であって、天然または遺伝子組換えした検出装置の表面に固定されたエレメントと蛍光誘導したターゲット分子との特異的相互作用または結合性を測定基準として検出する方法。
67. 少なくとも 1 つの遺伝子産物が内臓または外臓または外皮に発現される微生物の少なくとも 1 つの特異的遺伝子を検出および分離することを目的として使用される請求項 66 に記載の方法。
68. 測定された遺伝子セグメントの遺伝子産物の機能を決定することを目的として使用される請求項 68 に記載の方法。
69. いくつかの小さい細胞エレメントを共通するより大きい、またはいくつかの小さい細胞要素の内部から測定装置として分析する、および/または試料内の 1 又は複数の測定装置の空間座標の変化を許し、または伴わない連続的に分析することを特徴とするいくつかの小さい容器ユニットの 1 つ以上

の分子を測定することを目的とした請求項 1 に記載の方法。

70. 全てまたはいくつかの測定装置を含む測定装置を照射する光学系を有する、またはいくつかの測定装置の平行照射を行う光学システムを有するマルチアレイ検出器を使用する検出方法を行うことを目的とした装置。
71. 望ましくは 10^{-14} リットル以下の小さい測定装置中の、 $1 \mu\text{M}$ 以下の濃度に希釈した 1 つ以上の分子、分子複合体、および/または分子フラグメントを検出することを目的とした装置であって、
(a) 第 1 の装置のレーザ光を発生するためのレーザ光発生装置、
(b) 測定装置内にレーザ光を高集中度にフォーカスし、レーザ光が基本的に測定域のみをカバーするような測定装置にレーザ光をフォーカスすることを目的としたフォーカシング装置、
(c) 1 つ以上の分子、分子複合体および/または分子フラグメントのレーザ光照射によって発生した蛍光を検出することを目的とした検出装置、および
(d) 検出装置によって検出される蛍光量を制限するための測定装置に対して特異的に蛍光の発光域の材料に配置されたピンホール開口であって、特に直径 $100 \mu\text{m}$ 以下、望ましくは $20\text{--}30 \mu\text{m}$ 以下のピンホール開口、
以上 (a) 乃至 (d) の装置を含む装置。
72. 測定装置および検出装置のイメージ・スケールが $1:100$ 、 \dots 50 または $1:10$ であり、かつ、測定装置は各方向に $0.1 \mu\text{m}$ 以下の大きさを有する場合、測定ピンホール開口が平均直径約 $10 \mu\text{m}$ 、 $0 \mu\text{m}$ または $1 \mu\text{m}$ であることを特徴とする請求

項 71 に記載の装置。

73. レーザー光に関する光学系および/または蛍光に関する光学系が望ましくは 1.2N.A. 以上の高開口数を有することを特徴とする請求項 72 または 72 に記載の装置。
74. 測定装置がフォーカシング装置から最大 1,000 μm まで離れていることを特徴とする請求項 71 乃至 73 のいずれか 1 項に記載の装置。
75. フォーカシング装置がレーザー光をプレ・フォーカスするためのプレ・フォーカシング装置および測定装置上にプレ・フォーカスされたレーザー光をフォーカスするためのフォーカシング対物レンズを有することを特徴とする請求項 71 乃至 74 のいずれか 1 項に記載の装置。
76. フォーカシング対物レンズと測定装置との間の距離が 1.00 0 μm 以下であることを特徴とする請求項 74 または 75 に記載の装置。
77. プレフォーカシング装置とフォーカシング対物レンズの間に半透明の膜を置き、フォーカシング対物レンズにプレ・フォーカスしたレーザー光を屈折させることを特徴とした請求項 75 に記載の装置。
78. フォーカシング対物レンズに面さない半透明側にピンホール開口を配設することを特徴とする請求項 77 に記載の装置。
79. 検出装置が蛍光を検出するための少なくとも一つ、望ましくはそれ以上の検出器を有することを特徴とする請求項 71 乃至 78 のいずれか 1 項に記載の装置。
80. ピンホール開口と検出装置の間に少なくとも一つの光学フィルター、および/または少なくとも一つ以上の格納レンズおよび/または少なくとも一つの半透鏡および/または少なくとも一つの反射鏡を配設することを特徴とする請求項 71 乃至 78 のいずれか 1 項に記載の装置。

ズおよび/または少なくとも一つの半透鏡および/または少なくとも一つの反射鏡を配設することを特徴とする請求項 71 乃至 78 のいずれか 1 項に記載の装置。

81. 第一の波長と異なる波長の付加的レーザー光を発生するための付加的レーザー発生装置、基本的に付加的レーザー光が測定装置を部分的にカバーするように高圧に測定装置に測定付加的レーザー光をフォーカスするための付加的フォーカシング装置、一つ以上の分注、分注装置および/または分注フラグメントの誘起によって生成する蛍光の検出を目的とした付加的検出装置、および/または検出装置を運転する制御ユニットを特徴とする請求項 71 乃至 80 のいずれか 1 項に記載の装置。
92. (a) 第一の支持アーム (83) と第二の支持アーム (85) に直列して直列された第二の支持アーム (74) を含む 1 組支持体、
(b) 二つのレーザー光および二つの蛍光に対する光学エレメント(レンズ、フィルター、ミラー、検出器) の光軸を合わせ、これらを支持する第二の支持アーム (74) に面して末端に配設された支持装置 (83, 84) であって、フォーカスされたレーザー光が、測定装置を有し、かつ、第二の支持アーム (74) に面するように支持され、その両端間で望ましくは中間に分離可能なように配置されているガラススライド上に入射される防塵、
(c) 二つの支持装置 (83, 84) が長さ方向に第二の支持アーム (74) に面して互本端と向面して動くことができ、二つの支持装置 (83, 84) が第一の支持アーム (85) の長さ方向に張り出し、二つのレーザー光が支持装置 (83, 84) で支持されているレーザー光の光学エレメントに第一の支持アーム (85) の内側か

ら光学的開口 (69) を通して屈折鏡および/または半透鏡 (66, 67, 72, 73) によって屈折される。

以上 (a) 乃至 (c) の事項を特徴とする請求項 81 に記載の装置。

83. レーザー光用の光学エレメントが二つの支持装置 (83, 84) の内側に互いに向き合うように配置されており、かつ、蛍光用の光学エレメントが二つの支持装置 (83, 84) の外側に互いに向き合わないよう配置されていることを特徴とする請求項 92 に記載の装置。
84. フォーカシング対物レンズの一つが、特に該フォーカシング対物レンズの位置がオフセットを解消するようにピエゾ素子で動かされる調節エレメントで位置決めされることを特徴とする請求項 82 または 83 に記載の装置。